

Entwicklung einer Gesamtgenom-Sequenz für die molekulare  
Untersuchung der Ausbreitung von *Mycobacterium caprae* in  
Rinderbetrieben

von Stephanie Constanze Bröckl

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
(Dr. rer. biol. vet.)  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Entwicklung einer Gesamtgenom-Sequenz für die molekulare  
Untersuchung der Ausbreitung von *Mycobacterium caprae* in  
Rinderbetrieben

von Stephanie Constanze Bröckl

aus Rosenheim

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,  
Oberschleißheim

Mentor: Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

**Tag der Promotion:** 29. Juli 2017



*gewidmet meinen Eltern*

In der Wissenschaft gibt es nie ein Erreichen des Ziels.  
In der Wissenschaft gibt es immer nur Etappenziele.

*Henning M. Beier*  
deutscher Biologe und Mediziner  
\* 26.10.1940

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>X</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>I EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
1 Die Geschichte der Tuberkulose .....	3
2 Das Genus „ <i>Mycobacterium</i> “ .....	4
2.1 Taxonomie und Morphologie .....	4
2.2 Zellwand.....	4
2.3 Vorkommen und Einteilung .....	6
3 Der <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex (MTC) .....	7
3.1 Mitglieder des MTC .....	7
3.2 Ausgewählte Vertreter des MTC.....	8
3.2.1 <i>Mycobacterium caprae</i> .....	8
3.2.2 <i>Mycobacterium-bovis</i> -BCG-Lebendimpfstoff beim Mensch.....	10
3.3 Das mykobakterielle Genom .....	11
3.3.1 Das Genom von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> und <i>Mycobacterium caprae</i> .....	11
3.4 Region of Difference (RD)-Regionen .....	14
3.5 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) im MTC-Genom.....	16
3.6 SNP assoziierte Resistenzen und Differenzierung im MTC .....	18
3.7 Charakteristische SNPs von <i>Mycobacterium caprae</i> und <i>Mycobacterium bovis</i> ....	19
3.8 Virulenz Strategien der MTC-Spezies .....	20
3.9 Manifestation von humanen <i>Mycobacterium-caprae</i> -Infektionen.....	23
4 Die Rindertuberkulose.....	24
4.1 Die Tuberkulose beim Rind damals .....	24
4.2 Aktuelle Tuberkulosebekämpfung beim Rind in Deutschland .....	26
4.3 Die Rindertuberkulose als Zoonose .....	28
4.4 Die Rinder-und Rotwildtuberkulose in Österreich.....	29

4.5	Die Rindertuberkulose weltweit .....	33
4.6	Manifestation der Rindertuberkulose beim Rind .....	36
5	Diagnostik von Tuberkulose und Tuberkuloseerregern .....	37
5.1	Indirekter Erregernachweis .....	38
5.1.1	Intrakutane Tuberkulin-Untersuchung nach Mendel-Mantoux beim Rind.....	38
5.1.2	Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ )-Bluttest (Quantiferon-Test).....	39
5.1.3	BOVIGAM-IFN- $\gamma$ -Test für Rinder .....	41
5.2	Direkter Erregernachweis.....	42
5.2.1	Mikroskopischer Nachweis .....	42
5.2.2	Kulturoisolation .....	43
5.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	44
5.2.4	PCR als Molekularbiologischer Nachweis der Rindertuberkulose .....	44
5.3	Differenzierung von MTC-Mitgliedern .....	45
5.3.1	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT) .....	45
5.3.2	„DNA-STRIP-Technologie“ .....	46
5.3.3	Restriktions-Fragment-Polymorphismus (RFLP) .....	47
5.3.4	Differenzierung durch Spoligotyping.....	48
5.3.5	Differenzierung durch MIRU-VNTR.....	49
5.3.6	Differenzierung durch Large Sequence Polymorphisms (LSPs) .....	50
5.3.7	Differenzierung durch Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) .....	51
5.3.8	Whole Genome Sequencing (WGS) als Differenzierungsmethode .....	53
5.3.9	Nanopore-Sequencing .....	57
5.3.10	„Region of Different four“ (RD4)-Subtyping .....	58
<b>III</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>60</b>
1	Publikation 1 .....	60
2	Publikation 2 .....	72
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
	Diskussion zur Publikation 1.....	91
1	Bedeutung der Differenzierung von Erregern der Rindertuberkulose .....	91
2	Vorteile der RD4-Subtypisierung durch Multiplex-PCR-Ansatz .....	93

3	Grenzen der RD4-Subtypisierung durch Multiplex-PCR-Ansatz und Optimierungsvorschläge.....	95
4	Epidemiologie der <i>Mycobacterium-caprae</i> -RD4-Subtypen .....	96
5	Überprüfung von <i>Mycobacterium-caprae</i> -Isolaten aus Patienten am LGL.....	100
6	Die RD4-Region als stabiler Marker? .....	101
7	RD4-Subtypen und neue Deletionen .....	103
7.1	Geographische Verteilung der neuen RD4-Typen .....	105
7.2	Einfluss der neuen RD4-Typen in <i>Mycobacterium-caprae</i> -Genomen auf die Differenzierungsmöglichkeiten mittels des Multiplex-PCR-Ansatzes .....	107
8	Ausblick .....	108
	Diskussion zur Publikation 2.....	109
1	Bedeutung der Gesamtgenomsequenzierung und SNP-Typisierung .....	109
2	Technische und analytische Schwierigkeiten des WGS .....	110
3	SNP Analyse in <i>Mycobacterium-caprae</i> -Genomen aus Rinderbetrieben.....	113
4	„Who gave bTB to whom?“ .....	114
5	Voraussetzungen und Grenzen der SNP-Analyse .....	115
6	<i>Mycobacterium-caprae</i> -Epidemiologie .....	117
7	Ausblick .....	119
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>120</b>
<b>VI</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>122</b>
<b>VII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
<b>VIII</b>	<b>ANHANG TABELLEN UND ABBILDUNGEN .....</b>	<b>178</b>
<b>IX</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>182</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
AG	Arabinogalactan
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
bp	Basenpaar
bTB	Bovine Tuberkulose
CFP-10	10 kDa culture filtrate protein
CFU	Colony forming unit
DNA	desoxyribonucleic-acid/Desoxyribonukleinsäure
DR	direct repeat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESAT-6 6 kDa	early secretory antigenic target
EMB	Ethambutol
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
<i>gyrB</i>	Gen, das die $\beta$ -Untereinheit der DNA-Gyrase kodiert
HELI	hypothetische Helicase
HIV	human immunodeficiency virus
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IGV	Integrative Genomics Viewer
IL	Interleukin
INH	Isoniazid
IS	Insertionselement
kb	Kilobase (1000 bp)
LAM	Latin American Mediterranean Familie
<i>lepA</i>	Elongationsfaktor
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSP	Large Sequenz-Polymorphisms
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MIRU	mycobacterial interspersed repetitive unit
MJ network	Median-Joining Netzwerk
MOTT	<i>Mycobacteria</i> other than tubercle bacilli
MTC	<i>Mycobacterium-tuberculosis-complex</i>

NGS	Next generation sequencing
NTM	Nicht tuberkulöse Mykobakterien
NVL	non visible lesions
OIE	Office International des Epizooties
ORF	open reading frame
OTF	officially tuberculosis free
<i>oxyR</i>	putativer Regulator der Alkaly-Hydroperoxid Reduktase
PCR	polymerase chain reaction
PE	Prolin-Glutamat
PI	Phosphatidylinositol
PIM	Phosphatidylinositol Mannosid
PPE	Prolin-Prolin-Glutamat
<i>pncA</i>	Pyrazinamidase-Gen
PPD	purified protein derivative
PZA	Pyrazinamid
RD	Region of Difference
RD4	Region of Difference four
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RKI	Robert Koch-Institut
RMP	Rifampicin
RNA	ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SCCIT	single comparative cervical intradermal tuberculin
SM	Streptomycin
SNP	single nucleotide polymorphism
Sod	Superoxiddismutase
Spoligotyping	Spacer Oligonucleotide Typing
TB	Tuberkulose
TSN	Tierseuchennachrichten-System
VL	visible lesions
VNTR	variable number of tandem repeats
WGS	Whole Genome Sequenzing
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Karikatur nach Heinrich Zille .....	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der mykobakteriellen Zellwand.....	5
Abbildung 3:	Phylogenetischer Stammbaum des MTC .....	14
Abbildung 4:	Überblick über die IFN- $\gamma$ -Nachweismöglichkeiten zur Tuberkulosedagnostik .....	41
Abbildung 5:	<i>M.-caprae</i> -Kultur auf einem Festnährboden.....	44
Abbildung 6:	Prinzip der Probenaufbereitung für die „DNA-Strip-Technologie“ .....	46
Abbildung 7:	Prinzip der „DNA-Strip-Technologie“ .....	47
Abbildung 8:	Ablauf einer typischen <i>de-novo</i> -Gesamtgenomsequenzierung.....	54
Abbildung 9:	Prinzip der DNA-Sequenzierung und des <i>de-novo</i> -Genom- Assembly.....	55
Abbildung 10:	Schematische Darstellung eines Nanopore-Aufbaus .....	57
Abbildung 11:	Sequenzausschnitt aus der Gesamtgenom-Sequenzierung von <i>M. caprae</i> .....	58
Abbildung 12:	Alignment der Aminosäuresequenz aus der RD4-Zentralregion von <i>M.-caprae</i> -Isolaten des Allgäu-Subtyps .....	100
Abbildung 13:	RD4-Typen und Aufbau der RD4-Region bei alpinen <i>M.-caprae</i> - Isolatgenomen. ....	104
Abbildung 14:	Vorkommen der RD4-Typen und geographische Verteilung der 246 <i>M.-caprae</i> -Isolate im bayerischen und österreichischen Alpenraum.....	106

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS ANHANG

Abbildung A 1:	Deletionen in der RD4-Region und RD4-nahen-Regionen, sowie die Häufigkeit des Vorkommens bei <i>Mycobacterium-caprae</i> - Isolaten aus den Wirtstieren .....	179
Abbildung A 2:	Darstellung der Genomsequenz von <i>Mycobacterium caprae</i> im Bereich der RD4-Region.....	180
Abbildung A 3:	Mögliche Sequenz-Detektion, die der Multiplex-RD4-PCR-Ansatz bei den Typen 1 bis 7 erlaubt. ....	181



**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Die Gattungsmerkmale von Mykobakterien nach Suerbaum et al.....	4
Tabelle 2: Vergleich der Genome von verschiedenen <i>M.-tuberculosis</i> - und <i>M.-bovis</i> -Stämmen .....	13
Tabelle 3: Für Antibiotika-Resistenzen verantwortliche Gene in <i>M. tuberculosis</i> .....	18
Tabelle 4: Charakteristische SNPs von <i>M. caprae</i> und <i>M. bovis</i> zur Spezies- differenzierung .....	19
Tabelle 5: Von 2000 bis 2016 angezeigte, durch <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i> verursachte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Rinderbeständen in Deutschland und Bayern .....	27
Tabelle 6: Angezeigte Rindertuberkulosefälle ( <i>M.-caprae</i> -Infektionen) in Tirol und Vorarlberg in den Jahren 2008 bis 2015 .....	31
Tabelle 7: <i>M.-caprae</i> -positive Hirsche des landesweiten Rotwild-Tuberkulose- Monitorings in Tirol und Vorarlberg in den Jagdjahren 2009 bis 2015.....	32
Tabelle 8: In Österreich durch <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i> verursachte humane Tuberkulosefälle von 2010 bis 2015 .....	33
Tabelle 9: RD4-Subtypen Allgäu, Karwendel und Lechtal im Vergleich zu den Multiplex-RD4-PCR Ergebnissen von <i>M.-caprae</i> -Isolaten aus Rind und Rotwild, die keine Subtypisierung in einen der drei RD4-Subtypen erlauben .....	102

**TABELLENVERZEICHNIS ANHANG**

Tabelle A 1: PCR-Ergebnisse der RD4-Subtypisierung von drei <i>M.-caprae</i> -Isolaten aus Patienten anhand des in der Publikation veröffentlichten Multiplex-RD4-PCR-Ansatzes .....	178
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

# I EINLEITUNG

In den Industrieländern gilt die Tuberkulose als nahezu ausgerottet und findet kaum noch Beachtung, doch ihre globale Bedeutung als Infektionskrankheit und Zoonose hat sie dennoch nie verloren. Die Tuberkulose (TB) des Menschen ist laut World Health Organisation (WHO) neben AIDS die Infektionskrankheit, die am meisten Todesfälle fordert. Jährlich werden weltweit um die 9 Millionen Neuerkrankungen gemeldet und im Jahr 2015 wurden 1,8 Millionen tuberkulosebedingte Todesfälle verzeichnet (WHO, 2016). Nach Schätzungen ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit Tuberkulose infiziert, erkrankt jedoch häufig zeitlebens nicht. Als Verursacher der Tuberkuloseinfektion gelten hierbei Mykobakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) (HAUER et al., 2012). Zu den Mitgliedern des Komplexes gehören auch die Erreger der Rindertuberkulose (bovine Tuberkulose, bTB) *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium caprae*, die durch ihr zoonotisches Potenzial auch für humane Tuberkulosefälle verantwortlich sein können (DARAI et al., 2012). Obwohl Deutschland seit 1996 offiziell frei von Rindertuberkulose ist, die als anzeigepflichtige Tierseuche gilt, verursacht diese Tierseuche neben der Auswirkung auf die Tiergesundheit und Produktivität auch erhebliche volkswirtschaftliche Schäden und erfordert Bekämpfungsmaßnahmen zum Schutz von Mensch und Tier. Im Laufe der letzten Jahre wurden vor allem im bayerischen und österreichischen Alpenraum wieder verstärkt Ausbrüche von Rindertuberkulose durch *M. caprae* gemeldet (DOMOGALLA et al., 2013). Auch beim Rotwild wurden *M.-caprae*-Infektionen in den Alpenregionen von Österreich, Italien und Bayern seit einigen Jahren vermehrt dokumentiert (FINK et al., 2015). Wildtierreservoirare stellen eine permanente Infektionsgefahr und ein potenzielles Risiko für einen Erregeraustausch zwischen Rind und Wildtieren auf der Weide dar (SCHOEPP et al., 2012). Um Aussagen über das Infektionsgeschehen in einer Reservoirwirtpopulation oder über spontane Infektionsereignisse bei anderen empfänglichen Spezies („spill over“), sowie über eine Erregerübertragung zwischen Reservoirwirten, wie z. B. Rind und Rotwild treffen zu können, ist der epidemiologische Hintergrund der Tuberkuloseinfektionen von besonderer Bedeutung (VAN SOOLINGEN, 2001). Epidemiologische Überwachungsprogramme können zu einer effizienten Seuchenbekämpfung beitragen, setzen allerdings eine sichere und möglichst präzise Pathogen-Differenzierung voraus. Die genetische und phänotypische Vielfalt von *M. caprae* ist bislang noch nicht hinreichend bekannt und erschwert eine schnelle und sichere Charakterisierung des Erregers. Erst vergleichende Gesamtsequenzanalysen von mykobakteriellen Genomen des MTC haben spezifische Unterscheidungs-Regionen (Region

of Difference, RD) nachgewiesen und in *M.-caprae*-Isolaten aus Wild- und Nutztieren konnte durch gezielte PCR-Ansätze eine diagnostisch nutzbare, robuste genomische Heterogenität in der RD4-Region gezeigt werden (DOMOGALLA et al., 2013, RETTINGER et al., 2015).

Der **erste Teil** dieser Arbeit zeigt die Möglichkeit, eine schnelle und einfache Subtypisierung von *M.-caprae*-Isolaten anhand der genetischen, für *M.-caprae*-spezifischen RD4-Region vorzunehmen. Es wurde ein Multiplex-RD4-PCR-Ansatz entwickelt, der eine schnelle und gleichzeitige Differenzierung der bisher bekannten RD4-Variationen erlaubt und die Einordnung von *M.-caprae*-Isolaten in drei RD4-Subtypen (Allgäu, Karwendel und Lechtal) ermöglicht. Hierfür wurden 241 *M.-caprae*-Isolate aus Wild- und Nutztieren differenziert. Ferner konnte die geographische Verteilung der drei RD4-Subtypen in Rind und Rotwild gezeigt werden.

Der **zweite Teil** dieser Arbeit befasst sich mit der Gesamtgenomsequenzierung von *M.-caprae*-Isolaten, die erstmals Einblick in die genetische Diversität des Erregers gibt und epidemiologische Aussagen zur Infektionskette beim Rind mit Hinweisen zur bakteriellen Evolution von *M. caprae* ermöglicht hat. Es wird erstmalig eine Gesamtgenom-Sequenz von *M. caprae* veröffentlicht, die aus Isolaten von Rindertuberkulosefällen aus dem bayerischen Alpenraum stammen. Diese *M.-caprae*-Genomsequenz ermöglicht weltweit, als nahezu vollständige Referenzsequenz, die molekularbiologische Feincharakterisierung von *M.-caprae*-Genomen und hilft ferner, spezifische Bekämpfungsstrategien gegen diese Art der Rindertuberkulose zu etablieren. Im Rahmen der gesamten Studie wurden die Genome von über 300 *M.-caprae*-Tierisolaten aus Bayern und Österreich sequenziert. Die Feinanalyse der Genomsequenz im Bereich der RD4-Region identifizierte weitere Variationen, die bisher unbekannt waren und das geographische Vorkommen bei Isolaten der Wirtstiere konnte ebenfalls gezeigt werden. Zudem konnten detaillierte und präzise Informationen über die molekulare Epidemiologie der Rindertuberkulose in Rinderbetrieben, die mehrfach bTB-Fälle aufwiesen, gewonnen werden. Hierzu wurden spezifische genomweite einzelne Mutationen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) als Diversitätsmarker in den *M.-caprae*-Genomen identifiziert und für die Charakterisierung von phylogenetischen Populationsstrukturen in acht Rinderbetrieben verwendet. Die resultierenden Erkenntnisse ließen auf Übertragungswege von *M.-caprae*-Erreger schließen und zeigten einen Rind-zu-Rind Erregeraustausch als den dominanten bTB-verursachenden Faktor in den untersuchten Rinderbetrieben auf. Ferner konnte eine *M.-caprae*-Infektion durch die räumliche und zeitliche Sömmerung von Rindern auf alpinen Weiden nachgewiesen werden.

## II LITERATURÜBERSICHT

### 1 Die Geschichte der Tuberkulose

Die Tuberkulose, auch umgangssprachlich als „Schwindsucht“ (Phthisis) bezeichnet und geprägt von Hippokrates (ca. 460-375 v. Chr.), gilt als eine der ältesten Infektionskrankheiten der Menschheit (SUERBAUM et al., 2012). Im Jahre 1689 verwendet der englische Arzt Thomas G. Morton in seiner „Phthisiologia“ den Ausdruck „Tuberkel“ (Höcker, Knötchen), um die charakteristischen Läsionen der Lungenschwindsucht zu beschreiben (MORTON, 1689). 1832 leitete Johann Lucas Schönlein in seiner „*Lehre von der Tuberkulose*“ daraus den Begriff „Tuberkulose“ ab (GFG, 1988). Im 16./17. Jahrhundert ging ein Viertel aller Todesfälle auf Tuberkulose zurück, und im 19. Jahrhundert war die „weiße Pest“ die häufigste Todesursache bei Erwachsenen in Europa (SUERBAUM et al., 2012). Die wohl ältesten Tuberkulosefunde von 17.870 +/- 230 Jahre BP (before present, Kalenderjahre vor 1950) stammen aus mumifizierten Knochen einer ausgestorbenen Bisonart aus dem „Natural Trap Cave“ in Wyoming und wurden später durch Rothschild et al. als Tuberkulose identifiziert (ROTHSCHILD et al., 2001). Jedoch wurden fast alle der human-spezifischen Tuberkuloselinien in Afrika gefunden, und nur einige wenige wurden anderenorts isoliert (ACHTMAN, 2016). Im Jahre 1882 verkündete Robert Koch vor der Berliner Physiologischen Gesellschaft erstmals, den Erreger der Tuberkulose (Tuberkelbacillus) entdeckt zu haben (KOCH, 1932). Robert Koch konnte den Erreger der Volksseuche (Koch'scher Bacillus) durch Färbung, Züchtung in Reinkultur und Tierversuchen nachweisen, und erst vierzehn Jahre später wurde durch Lehmann und Neumann erstmalig die Gattung *Mycobacterium* beschrieben (LEHMANN & NEUMANN, 1896).



**Abbildung 1: Karikatur nach Heinrich Zille: „Ätsch! Wenn ick will, kann ick Blut in Schnee spucken!“ (GRUNDMANN & FRIEDRICH, 2012)**

## 2 Das Genus „*Mycobacterium*“

### 2.1 Taxonomie und Morphologie

Mykobakterien gehören der Ordnung der Actinomycetales an und zählen zu der Familie der Mycobacteriaceae. Die Gattung *Mycobacterium* umfasst derzeit mehr als 150 Arten. Sie zeichnen sich durch unbewegliche, gerade oder leicht gekrümmte, stäbchenförmige, säurefeste, sporenlose grampositive Bakterienzellen mit einer Breite von 0,2 bis 0,7 µm und einer Länge von 1 bis zu 10 µm aus (ROLLE & MAYR, 1993). In älteren Kulturen können auch mycelartige Verzweigungen gebildet werden oder filamentöse Formen auftreten, die dem Namen „Mykos: Pilz“ zugrunde liegen, die aber leicht in stäbchen- oder kokkenförmige Zellen (Kugelbakterien) zerfallen (AMANN-VESTI, 2006). Auf der Eigenschaft der Bildung von verzweigten Zellen (Mycelien) beruht auch der Name der Aktinomyzeten („Strahlenpilze“ vom griechischen „aktis“ der Strahl und „mykes“ der Pilz) (HARZ, 1877). Die wichtigsten Gattungsmerkmale sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

**Tabelle 1: Die Gattungsmerkmale von Mykobakterien**

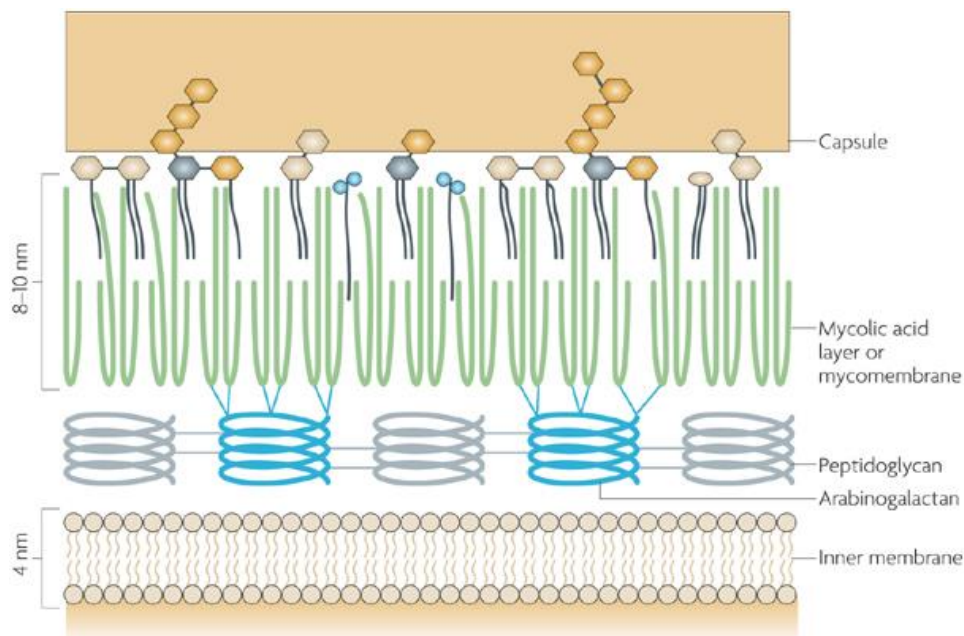
Merkmal	Ausprägung
Gramfärbung	positiv (aber schlechte GRAM Anfärbbarkeit)
O <sub>2</sub> -Toleranz	aerob, mikroaerophiles Wachstum möglich
Kohlenhydratverwertung	oxidativ
Sporenbildung	nein
Beweglichkeit	unbeweglich
Besonderheiten	lipidreiche Zellwand, Säurefestigkeit

Angaben nach Suerbaum et al. (SUERBAUM et al., 2012)

### 2.2 Zellwand

Der Aufbau der mykobakteriellen Zellwand entspricht einer grampositiven Zellwand mit der üblichen mehrschichtigen Peptidoglykanschicht. Jedoch sind Mykobakterien relativ widerstandsfähig gegenüber der Gram-Färbung, aufgrund eines an die Peptidoglykanschicht aufgelagerten Polymers aus Arabinose und Galaktose (Arabino-galactan), an das wiederum verschiedene kovalent gebundene, langkettige Lipide (u.a. Mykolsäuren) gebunden sind (DOVER et al., 2004). Entsprechend charakteristisch ist die Alkohol- sowie Säurefestigkeit der mykobakteriellen Zellwand, die in einigen Entwicklungsstadien durch eine säurefeste

Ziehl-Neelsen-Färbung zu beobachten ist, d.h. die Zellen sind widerstandsfähig gegen eine Säure-Alkohol-Entfärbung nach einer Fuchsin-Phenol-Färbung und einer anschließenden Anfärbung mit Methyleneblau (BRENNAN & NIKAIDO, 1995). Die lipidreiche Zellwand der Mykobakterien dient als wirkungsvolle Permeabilitätsbarriere für viele Moleküle und trägt so zu einer hohen Resistenz gegenüber vielen Antibiotika bei (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; DANILCHANKA et al., 2008) oder auch als physikalischer Schutz gegen intrazelluläre Phagozytose (WANG et al., 2000). In pathogenen Spezies wird diese äußere Zellwand auch zur Interaktion mit der Wirtszelle genutzt oder ist an der Immunantwort und Virulenz beteiligt (COX et al., 1999; STROHMEIER & FENTON, 1999; KAN-SUTTON et al., 2009). Die einzelnen Bestandteile der mykobakteriellen Zellwand sind in Abbildung 2 gezeigt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der mykobakteriellen Zellwand nach Abdallah et al. Die Zellwand besteht hauptsächlich aus einem großen Zellwandkern, der drei kovalent gebundene Strukturen enthält: Peptidoglykan (grau), Arabinogalactan (blau) und Mykolsäuren (grün). Die kovalente Verknüpfung der Mykolsäuren ergibt eine hydrophobe Schicht mit einer extrem niedrigen Fluidität. Diese Schicht wird auch als Mykomembrane bezeichnet. Der äußere Teil der Mykomembrane enthält verschiedene Lipide (u.a. Cord Faktor), in welche die Mykolsäuren eingelagert sind und welche meist spezifisch für Mykobakterien sind. Die äußere Schicht wird als Kapsel bezeichnet und enthält hauptsächlich Polysaccharide (Glucan und Arabinomannan) (ABDALLAH et al., 2007)

Für die Zuordnung eines Organismus zum Genus *Mycobacterium* wurde neben der a) Säure-Alkohol-Festigkeit und der b) Mykolsäure-Einlagerung in der Zellwand, die durch Pyrolyse in Fettsäuremethylester mit einer Kohlenstoffatom-Kettenlänge von C<sub>22</sub> zu C<sub>26</sub> gespalten werden kann, noch ein drittes Standardkriterium festgelegt; c) ein Guanin-/Cytosin- (G/C)-Gehalt der DNA von 61 bis 71 mol Prozent (LEVY-FREBAULT & PORTAELS, 1992).

## 2.3 Vorkommen und Einteilung

Die meisten Mykobakterienspezies sind obligat aerob lebende Saprophyten mit einem chemoorganotrophen Energiestoffwechsel, die ubiquitär in der Natur (Böden, Gewässer) verbreitet sind und treten in der Regel nur unter bestimmten Bedingungen als pathogene Infektionserreger bei Mensch und Tier auf (KONÍČKOVÁ & PODOJIL, 1983; ROLLE & MAYR, 1993). Man unterscheidet zwischen schnell wachsenden („rapid growers“) und langsam wachsenden Spezies („slow growers“) (STAHL & URBANCE, 1990). Die Unterscheidung hierbei beruht darauf, ob ein sichtbares Wachstum von isolierten Kolonien auf einem festen Medium unter optimalen Inkubationstemperaturen nach mehr oder weniger als sieben Tage gezeigt wird. Außerdem sind langsam wachsende Mykobakterien, im Gegensatz zu den schnell wachsenden Arten, nicht imstande, auf Standardmedien, wie Nähragar oder Peptonagar, zu wachsen (LEVY-FREBAULT & PORTAELS, 1992). Die meisten (obligat oder fakultativ) pathogenen Krankheitserreger sind unter den langsam wachsenden Mykobakterien zu finden, hingegen sind viele der schnell wachsenden Mykobakterien apathogen (DWORKIN et al., 2006). Interessanterweise besitzen „slow growers“ nur einen Satz an RNA-codierenden Genen, während „rapid growers“ mindestens zwei Kopien dieser RNA-codierenden Gene besitzen (BERCOVIER et al., 1986). Darüber hinaus können durch Vergleiche in der 16S-rRNA-Sequenz eindeutig die schnell wachsenden Mykobakterien von den langsam wachsenden Spezies abgetrennt werden (STACKEBRANDT & SMIDA, 1988; STAHL & URBANCE, 1990). Die Unterteilung der Mykobakterien erfolgt in die a) nicht tuberkulösen Mykobakterien (NTM), die auch als *Mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT) bezeichnet werden, die b) obligat pathogenen Erreger der Tuberkulose, die unter dem *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC) zusammengefasst werden und die c) obligat humanpathogene Spezies *M. leprae* (NEUMEISTER et al., 2009). Der Erreger *M. leprae* ist die einzige Spezies des Genus *Mycobacterium*, die nicht kultivierbar ist. Die Spezies beschränkt sich hauptsächlich auf den indischen Subkontinent, Teile Asiens und Lateinamerika. Nach einer Infektion treten meist

schwere Verstümmelungen der Gliedmaßen, chronische Geschwürbildungen und Anästhesien auf (GILLEN, 2007).

### 3 Der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC)

#### 3.1 Mitglieder des MTC

Der Begriff „*Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex“ (MTC) fasst genetisch nahverwandte, obligat pathogene Erreger der Tuberkulose zusammen (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002). Die Mitglieder des MTC haben einen hohen Grad an genetischer Homogenität (99,9 %), weisen einen niedrigen Genpolymorphismus auf und zeigen eine fast identische 16 rRNA Sequenz. Ein horizontaler Gentransfer und Rekombinationsereignisse sind im MTC sehr selten, dennoch sind phänotypische und Wirtsunterschiede zu beobachten (SREEVATSAN et al., 1997; BROSCH et al., 2002; HUGHES et al., 2002; GUTACKER et al., 2002; MCEVOY et al., 2012). Die Mitglieder des MTC repräsentieren eine Gruppe von Arten oder Ökotypen (AMANN-VESTI, 2006), die rein parasitär leben und sich in der Umwelt nicht vermehren. Hierzu zählen *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis*, und der Impfstamm *M. bovis* Bacille-Calmette-Guérin (BCG) (VAN SOOLINGEN et al., 1994; BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002; HUARD et al., 2006). *M. mungi* und *M. orygis* wurden im Jahr 2010 und 2012 als neue Spezies mit in den MTC aufgenommen (ALEXANDER et al., 2010; VAN INGEN et al., 2012). *M. tuberculosis* und *M. africanum* sind für den Großteil der humanen Tuberkulosefälle verantwortlich, wobei *M. tuberculosis* auch bei Rindern nachgewiesen werden konnte (TESINK, 1970; BERG et al., 2009; THAKUR et al., 2012). Die klassischen Rindertuberkulose-verursachenden Arten *M. bovis* und *M. caprae* spielen die wichtigste Rolle bei Nutztieren und Wildwiederkäuern. Diese beiden Spezies mit ihrer großen Anpassungsfähigkeit zeigen jedoch ein breites Wirtsspektrum und kommen als Krankheitserreger bei einer Vielzahl von Tierarten sowie beim Menschen vor (O'REILLY & DABORN, 1995; GRANGE, 2001). *M. bovis* konnte in Portugal beim Wildschwein (*Sus scrofa*) (SANTOS et al., 2009), in Frankreich im Wildtierbestand beim Fuchs (*Vulpus vulpus*) und Rehwild (*Capreolus capreolus*) (ZANELLA et al., 2008), im Doñana National Park in Spanien beim Rotwild (*Cervus elaphus*) (GORTAZAR et al., 2008), in England im Dachs (*Meles meles*) (JENKINS et al., 2008) oder auch in Südafrika beim Nashorn (*Diceros bicornis minor*) (ESPIE et al., 2009) nachgewiesen werden. Zu beachten ist dabei aber immer, ob es sich um Reservoirwirte oder zufällige Übertragungsereignisse („spill over“) handelt. Bevor



die standardmäßige Pasteurisierung von Milch im Jahr 1947 eingeführt wurde, war *M. bovis* oft für die humane Tuberkuloseerkrankung verantwortlich (COLE, 2002; AMANN-VESTI, 2006).

Auch *M. caprae* ist als Verursacher von Tuberkuloseinfektionen beim Mensch (KUBICA et al., 2003; CVETNIC et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2009; NEBREDA et al., 2016), im Nutztierbestand beim Rind (*Bos taurus*) (PRODINGER et al., 2005) und auch im Wildtierbestand beim Rotwild (*Cervus elaphus*) (PRODINGER et al., 2002), in der Ziege (*Capra aegagrus hircus*), im Schwein (*Sus scrofa domestica*), im Fuchs (*Vulpus vulpus*) (RODRIGUEZ et al., 2011), im Wildschwein (*Sus scrofa*) und auch im Kamel (*Camelus ferus*) (ERLER et al., 2004) und anderen Zootieren (PATE et al., 2006) beschrieben worden.

Die weiteren, weniger bekannten Mitglieder des MTC sind *M. microti* (Wühlmaus) und der mit ihm nahverwandte Erreger *M. pinnipedii* (Robbe), der oft fälschlicherweise auch als *M.-bovis*-Subspezies identifiziert wird (PALOMINO et al., 2007). Ein etwas ausgefallener Vertreter des MTC ist *M. canettii*, der nur sporadisch für Tuberkulosefälle verantwortlich ist und lediglich bei Patienten aus der Gegend vom „Horn von Afrika“ isoliert worden ist. Dieser Vertreter ist molekulargenetisch wesentlich vielfältiger als die anderen Mitglieder des MTC und zeigt neben eines größeren Genoms auch einen deutlichen horizontalen Genaustausch (SUPPLY et al., 2013). Die anderen Mitglieder des MTC wurden alle nur selten beschrieben, wie *M. mungi* (Mungo) (ALEXANDER et al., 2010) oder *M. orygis* (Antilope) (GEY VAN PITTIUS et al., 2012) und eine, als vorläufig „Schimpansenbazillus“ bezeichnete Abstammungslinie des MTC (COSCOLLA et al., 2013). Der attenuierte *M.-bovis*-BCG-Stamm wurde aus dem virulenten Wildtyp Tuberkelbazillus *M. bovis* abgeleitet und wird teils noch als Impfstoff zur Prävention von Tuberkulose verwendet (GUÉRIN, 1953).

## 3.2 Ausgewählte Vertreter des MTC

### 3.2.1 *Mycobacterium caprae*

*M. caprae* ist erst seit 2003 als eigenständige Spezies im MTC anerkannt (ARANAZ et al., 2003). Zuvor war *M. caprae* unter dem Namen *M.-tuberculosis*-Subspezies *M. caprae* vertreten (ARANAZ et al., 1999), später wurde die Spezies unter der Bezeichnung *M.-bovis*-Subspezies *M. caprae* fälschlicherweise zu *M. bovis* gezählt (NIEMANN et al., 2002). *M. caprae* konnte erstmals 1999 aus einer Ziege isoliert werden, die damals noch als

Hauptwirt galt (GUTIERREZ et al., 1995; ARANAZ et al., 1996). *M.-caprae*-Funde wurden in Spanien, Österreich (PRODINGER et al., 2002), Frankreich (HADDAD et al., 2001), Deutschland (ERLER et al., 2004), Ungarn (ERLER et al., 2004), Italien, Slowenien (ERLER et al., 2004) und der Tschechischen Republik (PAVLIK et al., 1998) gemeldet.

In bestimmten Regionen Mitteleuropas, in denen *M. caprae* als Hauptverursacher für die Rindertuberkulose vertreten ist, sind auch vermehrt humane *M.-caprae*-Fälle zu finden (PRODINGER et al., 2002; KUBICA et al., 2003; MOSER et al., 2014). Ferner zeigt *M. caprae* in Deutschland eine unterschiedliche regionale Verteilung mit einem deutlichen Nord-Süd-Gefälle, von weniger als 10 % in Norddeutschland und mehr als 80 % in Süddeutschland bzw. in den Grenzregionen Österreichs (Abschnitt 4.1) (PRODINGER et al., 2002; PALOMINO et al., 2007).

Zur Differenzierung *M. caprae* von den anderen Mitgliedern des MTC kann zum einen die frühere Standardtechnik des DNA-Fingerprintings - die Analyse des RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Abschnitt 5.3.3) - verwendet werden, in dem *M. caprae* ein sehr spezifisches DNA-Fingerprinting-Muster zeigt. Zum anderen zeigt die Methode des Spoligotypings (Abschnitt 5.3.4) für *M. caprae* einen charakteristischen Code und die Spezies bildet durch fehlende Spacer-Regionen ein homogenes Cluster (ARANAZ et al., 2003). Nach Erhalt der ersten Gesamtgenomsequenzdaten von *M. caprae* seit 2013 ist eine Differenzierung von *M.-caprae*-Isolaten aus dem Alpenraum in drei Subtypen (Allgäu, Lechtal und Karwendel) anhand der Präsenz oder Absenz von Sequenzbereichen der RD4-Region möglich geworden. Damit konnte auch eine Zuordnung der Subtypen zum Vorkommen in bestimmten geographischen Regionen vorgenommen werden (Abschnitte 3.4 und 5.3.10) (DOMOGALLA et al., 2013).

Es wurde angenommen, dass jüngere *M.-caprae*-Isolate einen kürzlich entstandenen Genotyp repräsentieren. Jedoch von den bisher bekannten zoonotischen *M.-caprae*-Infektionen, liegt das Durchschnittsalter der Patienten bei 66,1 Jahren. Daher ist eine Reaktivierung einer lang zurückliegenden Infektion, bevor Kontrollmaßnahmen zur Rindertuberkulose in den 50er Jahren angewendet wurden, viel wahrscheinlicher, als die Annahme einer kürzlich aufgetretenen Neuinfektion mit speziellen *M.-caprae*-Genotypen (PALOMINO et al., 2007). Folglich war *M. caprae* bereits früher präsent und wurde nach der alten Nomenklatur als *M.-bovis*-Subspezies geführt. Erst neuere molekularbiologische Analysen der MTC Spezies zeigen ferner, dass *M. caprae* phylogenetisch älter als *M. bovis* sein dürfte (Abschnitt 3.4) (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002).

### 3.2.2 *Mycobacterium-bovis*-BCG-Lebendimpfstoff beim Mensch

Als im 18. Jahrhundert eine neue Entdeckung veröffentlicht wurde, in der eine Infektion mit Kuhpocken zur Immunität gegen Pocken beim Menschen führte, setzte man große Hoffnung in die Verwendung von *M. bovis* als Impfstoffkandidat. Der Erreger der Rindertuberkulose sollte zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen die menschliche Tuberkulose verhelfen. Allerdings waren *M.-bovis*-Infektionen mit ähnlicher Konsequenz einer fatalen Tuberkuloseausprägung auf den Menschen übertragbar. Die französischen Forscher Albert Calmette und Camille Guérin entwickelten aus einem ursprünglich pathogenen Stamm von *M. bovis* über 13 Jahre durch 230 Kulturpassagen einen abgeschwächten, attenuierten Stamm Bazillus-Calmette-Guérin (BCG), oder auch *M. bovis* BCG genannt (GUÉRIN, 1953). *M. bovis* BCG wurde erstmals im Jahre 1921 an Menschen verabreicht. In vielen Ländern, vor allem in Entwicklungsländern, ist er heute noch als Lebendimpfstoff weit verbreitet und wird, obwohl in diesen Ländern eine starke Verbreitung von HIV-Infektionen vorherrscht, zur Tuberkuloseprophylaxe eingesetzt. Durch diese Kombination von HIV-Prävalenz und Tuberkuloserisiko ist es möglich, dass Kinder mit unentdeckter HIV-Infektion eine BCG-Impfung erhalten und hierdurch Schaden nehmen können (HESSELING et al., 2007; 2009). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat sich dafür ausgesprochen, die BCG-Impfung in Ländern mit hohem Tuberkuloserisiko dennoch unmittelbar nach der Geburt der Kinder durchzuführen (WHO, 2007). In Deutschland wird seit 1998, auf Anraten des Robert-Koch-Institutes (RKI), die Impfung aufgrund von Nutzen- und Risikoabwägung nicht mehr verabreicht. Ein weiterer Grund für die Einstellung der Tuberkuloseimpfung in Industrieländern war die erschwerte Tuberkulose-Diagnostik bei Geimpften. Nach einer BCG-Impfung liefert ein Tuberkulin-Test über viele Jahre oftmals falsch-positive Ergebnisse, und somit fehlte ein wichtiges diagnostisches Mittel zum sicheren Nachweis über den Kontakt mit virulenten Tuberkulosebakterien (COHN, 2001). Die jahrelange Subkultivierung von *M. bovis* BCG führte zu genetischen Polymorphismen, Deletionen und daraus resultierenden regulatorischen Mutationen (MAHAIRAS et al., 1996). Dennoch kann auch die Infektion mit *M. bovis* BCG beim Menschen zu einer Lungentuberkulose führen (JIANG et al., 2015).

### 3.3 Das mykobakterielle Genom

#### 3.3.1 Das Genom von *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium caprae*

Die vollständige Sequenzierung der Genome von *M. tuberculosis* H37Rv im Jahr 1998 (COLE et al., 1998) und *M. bovis* im Jahr 2003 (GARNIER et al., 2003) brachte erste eindeutige Einblicke in die Evolution, Wirtsspezifität und Pathobiologie dieser beiden Mitglieder des MTC. Bei *M. bovis* handelte es sich um den klinischen Stamm *M. bovis* AF2122/97, der 1997 aus einem Rind in Großbritannien isoliert wurde. *M. tuberculosis* wurde 1905 aus einer humanen Probe isoliert, und 1934 erfolgte die Unterteilung in den virulenten H37Rv- und den avirulenten H37Ra-Stamm (STEENKEN et al., 1934). *M. tuberculosis* H37Rv ist der am häufigsten verwendete pathogene Stamm in der Tuberkuloseforschung (MÉDIGUE et al., 2002). Das Genom von *M. tuberculosis* H37Rv besteht aus 4.411.532 bp (Tabelle 2) (COLE et al., 1998; SMITH, 2003; ZHENG et al., 2008). Es wurden 3.995 offene Leseraster (open reading frame, ORF) identifiziert und mit Rv-Nummern durchnummeriert (COLE et al., 1998). In einer für das *M.-tuberculosis*-H37Rv-Genom erstellten Datenbank (TubercuList) können Informationen über den speziellen Gen-Namen, die Genposition im Genom, die Funktion der Gene und die Nukleotidsequenz abgerufen werden (COLE et al., 1998; MÉDIGUE et al., 2002). Das *M.-tuberculosis*-H37Rv-Genom mit seinen ca. 4000 Genen (COLE et al., 1998; SMITH, 2003) enthält alleine 200 Gene, die für Enzyme des Fettsäurestoffwechsels kodieren. Hundert dieser Enzyme sind für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren verantwortlich, und es wird diskutiert, dass die große Anzahl an Enzymen dem Pathogen ermöglicht, im Gewebe des infizierten Wirts zu wachsen (SMITH, 2003). Kurz nach der Genom-Veröffentlichung wurden 41 „Variable Number of Tandem Repeats“ (VNTR)-Loci identifiziert (SUPPLY et al., 2000) und als MIRU (mycobacterial interspersed repetitive units) 1 bis 41 bezeichnet, wovon 12 polymorph in *M. tuberculosis* H37Rv sind. Insgesamt sind seither 59 polymorphe VNTR-Loci identifiziert worden (RORING et al., 2002; SMITTIPAT et al., 2005). Im Genom von *M. tuberculosis* H37Rv liegen die meisten der Insertions-Sequenzen zwischen Genen (intergenic) oder in nicht-kodierenden Regionen, und viele dieser Sequenzen sind zu Clustern zusammengefasst. Diese Hot-Spots von Insertionen verhindern eine Inaktivierung von nachfolgenden Genen (COLE et al., 1998). Im Jahr 2002 wurde nach langer *in-vitro*-Kultivierung des Laborstamms H37Rv die Gesamtgenomsequenz von einem weiteren *M.-tuberculosis*-Stamm veröffentlicht - *M. tuberculosis* CDC1551 (FLEISCHMANN et al., 2002). Die Genomgröße des

*M. tuberculosis* CDC1551 entspricht 4.403.836 bp und es wurden 4.249 ORFs identifiziert, jedoch ist die ORF Anzahl Algorithmus-abhängig (GARNIER et al., 2003).

Das 2002 veröffentlichte Gesamtgenom von *M. bovis* AF2122/97 weist mit einer Genomgröße von 4.345.492 bp das kleinste Genom im MTC auf und ist in einem einzigen kreisförmigen Chromosom mit einem durchschnittlichen G/C Gehalt von 65,63 % angeordnet. Das Genom enthält 3.952 kodierende Gene, die für Proteine, einschließlich eines Prophagen und 42 IS-Elementen codieren. Die Nukleotidsequenz zeigt eine 99,95%ige Übereinstimmung mit dem von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* CDC1551 mit einem identischen G/C Gehalt von 65,63 %. Beweise für zusätzliche Translokationen, Duplikationen oder Inversionen wurden im *M.-bovis*-Genom nicht gefunden. Bei *M. bovis* wurde nur ein Genlocus (TbD1) identifiziert, der in den meisten *M.-tuberculosis*-Stämmen hingegen fehlt. Hauptsächlich Deletionen haben die Genomgröße von *M. bovis* verringert. Es wurden elf Deletionen im Genom von *M. bovis* gefunden, die eine Größenspanne von ca. 1 bis 12.7-kb aufweisen. Im Vergleich zu den beiden *M.-tuberculosis*-Stämmen wurden weniger potentiell proteincodierende Gene gefunden und über 2.420 SNPs identifiziert. Im Allgemeinen zeigen Zellwandkomponenten und sekretorische Proteine größere Variationen (GARNIER et al., 2003).

Auch avirulente BCG-Stämme, wie beispielsweise *M. bovis* BCG-Pasteur 1173P2 (BROSCH et al., 2007) und BCG-Tokyo (SEKI et al., 2009) zeigen aufgrund zahlreicher Deletionen kleinere Genomgrößen (Tabelle 2) im Vergleich zur Genomsequenz von *M. tuberculosis* H37Rv (PHILIPP et al., 1996; PAN et al., 2011). Dennoch ist das *M.-bovis*-BCG-Genom aufgrund zweier unabhängiger Tandem-Duplikationen, DU1 und DU2 nahezu 30 kb größer, als das Genom von *M. bovis* AF2122/97 (BROSCH et al., 2000; 2007).

**Tabelle 2: Vergleich der Genome von verschiedenen *M.-tuberculosis*- und *M.-bovis*-Stämmen**

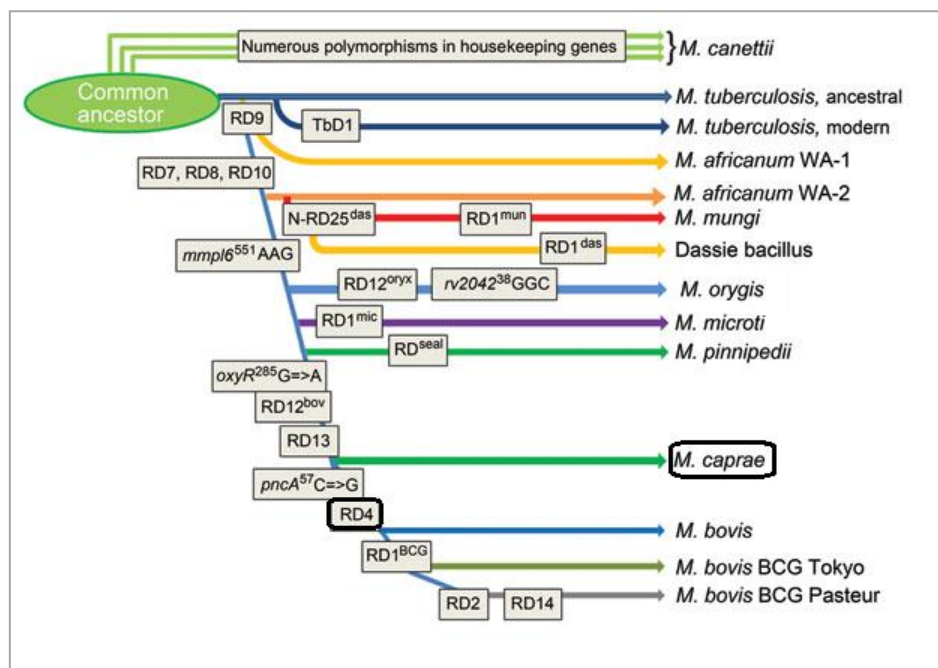
Stamm	Genomgröße (bp)	Codierende Gene	G/C Gehalt (%)	SNPs im Vergleich zu <i>M. bovis</i> AF2122/97
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	4.411.532	3.995	65,6	2.437
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	4.403.836	4.249	65,6	2.423
<i>M. bovis</i> AF2122/97	4.345.492	3.952	65,6	-
<i>M. bovis</i> BCG-Pasteur 1173P2	4.374.522	3.954	65,6	736
<i>M. bovis</i> BCG-Tokyo	4.371.711	3.950	Nicht bekannt	Nicht bekannt

Angaben nach COLE et al., 1998; GARNIER et al., 2003; BROSCHE et al., 2007 und SEKI et al., 2009

*M. caprae* konnte im Jahr 1999 erstmals in Spanien in einer Ziege nachgewiesen werden und wurde anfangs noch zu einer Subspezies von *M. tuberculosis* (ARANAZ et al., 1999) und später von *M. bovis* gezählt (NIEMANN et al., 2002). Seit 2003 wird *M. caprae* aufgrund von SNPs in bestimmten Genen sowie Deletionen und der Existenz spezieller, längerer Sequenzabschnitten (Regions of Difference, RDs) als eigenständige Spezies im MTC definiert (ARANAZ et al., 2003) - nicht zuletzt auch aufgrund phylogenetischer Untersuchungen des MTC, mit dem Ergebnis, dass *M. caprae* phylogenetisch älter als *M. bovis* sein kann (BROSCHE et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002). Im Jahr 2013 konnte von Domogalla et al. für Isolate aus dem Alpenraum gezeigt werden, dass in der Spezies *M. caprae* verschiedene Subtypen mit unterschiedlichen Deletionen in der RD4 vorkommen. Demzufolge wurden drei Subtypen „Allgäu“, „Karwendel“ und „Lechtal“ benannt, die sich durch verschiedene PCR Ansätze unterscheiden lassen (DOMOGALLA et al., 2013; RETTINGER et al., 2015). Im Jahr 2015 wurden erstmals die Contigs eines *M.-caprae*-Wildtyps, der aus einer Ziege isoliert wurde, veröffentlicht (LA FUENTE et al., 2015 b). In einer weiteren Veröffentlichung von La Fuente et al. zeigte der Genomvergleich verschiedener Genomregionen von *M. tuberculosis* mit *M. bovis* bzw. *M. caprae* Unterschiede in der Genomsequenz (SNPs), einschließlich ganzer Genfamilien, die für die bakterielle Infektion und Übertragung wichtig sind und unterstützt *M. caprae* als eine bedeutende, separate Spezies im MTC (Abschnitt 3.8) (LA FUENTE et al., 2015 a).

### 3.4 Region of Difference (RD)-Regionen

Im mykobakteriellen Genom wurden durch vergleichende Genomanalysen zwischen den Referenzstämmen *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* BCG-Pasteur variable Regionen (RD-Regionen, Region of Difference) identifiziert (GORDON et al., 1999), die ihren Ursprung in synonymen LSPs (Large Sequenz-Polymorphisms) finden (Abschnitt 5.3.6) (BEHR, 2001; HIRSH et al., 2004; ALLAND et al., 2007; BORITSCH et al., 2014). Insgesamt wurden durch verschiedene molekularbiologische Techniken und Vergleiche von Genomsequenzen 14 RDs identifiziert, die in den Genomen der MTC-Mitglieder unterschiedlich vorhanden sind. Diese RDs sind Genomsequenzen mit einer Länge von 2 - 12,7-kb, durch die eine Speziesdifferenzierung erfolgen kann (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002). In den Genomen von *M. tuberculosis* und *M. canettii* sind alle RD-Sequenzen vorhanden, und daher wird eine Entwicklung der anderen MTC-Mitglieder aus diesen beiden Stämmen angenommen. Eine evolutionäre Einordnung mit einem möglichen Evolutions-Stammbaum für den MTC kann erstellt werden, indem man davon ausgeht, dass die jeweilige RD-Sequenz im Vorgängerstamm vorhanden ist (Abbildung 3) (BROSCH et al., 2002).



**Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum des MTC aufgrund des Vorhandenseins oder Fehlens von RD-Regionen und SNPs im Genom der MTC-Mitglieder. Die Deletionen der RD-Regionen und SNPs in den jeweiligen Genen sind als Quadrate dargestellt. Der Stammbaum basiert auf Brosch et al. (BROSCH et al., 2002) und wurde durch van Ingen et al. (VAN INGEN et al., 2012) und Domogalla (DOMOGALLA, 2014) modifiziert**

Das *M. bovis* Genom besitzt trotz seiner kleinen Genomgröße im Vergleich zu anderen Mitgliedern des MTC das breiteste Wirtsspektrum (BROSCH et al., 2001). Jedoch wird diese Wirtsadaptation nicht etwa durch zusätzliche neue *M.-bovis*-spezifische Virulenzgene erreicht, sondern vielmehr durch Genverluste und geänderte Genexpressionen, bedingt durch die zahlreichen Deletions-Ereignisse und Sequenzvariationen (BROSCH et al., 2001; 2002; GARNIER et al., 2003). Die vergleichenden Sequenzanalysen zwischen *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* BCG-Pasteur zeigten, dass der Deletions-bedingte DNA-Verlust bei *M. bovis* BCG-Pasteur insgesamt 14 variable DNA-Regionen (RD1-14) betrifft (BROSCH et al., 2002). Interessanterweise sind im virulenten *M.-bovis*-Wildtyp ebenfalls die meisten RD-Regionen (RD4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 und 13) deletiert, jedoch im Vergleich zum attenuierten *M.-bovis*-BCG-Stamm, bei dem die RD-Regionen 1, 2 und 14 ebenfalls deletiert sind, sind genau diese RD-Regionen vorhanden (BROSCH et al., 2002; LEWIS et al., 2003). Die wichtigste Deletion im attenuierten *M.-bovis*-BCG-Stamm stellt der Verlust der RD1-Region dar, denn diese Region codiert für das ESAT-6 Gen, welches eine wichtige Rolle bei der T-Zellantwort des Wirts spielt (Abschnitt 3.4) (RENSHAW et al., 2002; LEWIS et al., 2003; STOOP et al., 2011). *M. bovis* weist abgesehen von den attenuierten *M.-bovis*-BCG-Stämmen, die fünf RDs innerhalb von nur 50 Jahren durch intensive *in-vitro*-Passagierung verloren haben (BEHR et al., 1999; TAYLOR et al., 2007 a) die meisten RD-Deletionen auf und wird als das jüngste pathogene Mitglied des MTC diskutiert (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2007 a). Die Hypothese einer *M.-tuberculosis*-Abstammung von *M. bovis* nach der Rinderdomestikation (STEAD et al., 1995) wurde demnach widerlegt (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2007 a).

Die RD4-Region besteht aus einer 12,7-kb umfassenden Sequenz und die Absenz dieser RD4-Region wurde in *M. bovis* als Unterscheidungsmerkmal zu *M. caprae* beschrieben. Verschiedene PCR-Ansätze nutzen die fehlende RD4-Sequenz, um *M. bovis* von den anderen Erregern des MTC abzugrenzen (GORDON et al., 1999; PINSKY & BANAEI, 2008; HALSE et al., 2011). Die Deletionen in der RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12 und RD13 wurden für *M. bovis* und *M. caprae* beschrieben. Die RD4 galt als einziges Unterscheidungskriterium bezogen auf die RD-Regionen zwischen *M. bovis* und *M. caprae*, da in *M. caprae* die RD4 konserviert vorliegen soll (ARANAZ et al., 2003). Erst nach einzelnen Gesamtgenomsequenzierungen konnte dieses Unterscheidungskriterium als irreführend widerlegt werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Genom von *M. caprae* die RD4-Region zwar auch komplett erhalten vorliegen kann, jedoch auch unterschiedliche, sogar die gesamte RD4-Region betreffende, Deletionen vorhanden sein können (DOMOGALLA et



al., 2013; 2014). Mittlerweile wurde auch in Spanien von RD4-negativen *M.-caprae*-Isolaten berichtet (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014).

### 3.5 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) im MTC-Genom

SNPs sind neben Insertionen und Deletionen die häufigste und detailgenaueste Form der genetischen Variationsdefinition im MTC. Durch den Fortschritt in der DNA-Sequenzierung können inzwischen tausende dieser einzelnen Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) in klinischen Isolaten des MTC identifiziert werden. Insgesamt wurden 9.037 spezifische SNPs durch Sequenzierung von 21 klinischen Stämmen entdeckt (COMAS et al., 2010; STUCKI & GAGNEUX, 2013; MULLER et al., 2014). SNPs können Resistenzen verursachen und für die Virulenz verantwortlich sein. Außerdem repräsentieren SNPs robuste Marker zur Herleitung von Phylogenien und zur Spezies-Klassifizierung (GAGNEUX & SMALL, 2007). SNPs können aber auch zur Ermittlung von evolutionären Distanzen zwischen Stämmen verwendet werden, z.B. kann aus ihrem genetischen Abstand die abgelaufene Entwicklungszeit abgeschätzt werden, wenn eine Mutationsrate bekannt ist (FORD et al., 2011).

Der Begriff „SNP“ wird oft auch als Synonym für „Mutation“, „Polymorphismus“ oder „Substitution“ verwendet, streng genommen ist die Änderung in einem einzelnen Basenpaar jedoch eine Punkt-Mutation und geschieht durch Fehler während der DNA-Replikation oder als Folge von DNA-Schäden. Solche Mutationen sind im Ergebnis meist schädlich und selten, da sie in der Regel über Reparationsmechanismen schnell entfernt werden. Hingegen können auch nützliche „positive“ Mutationen durch „positive“ Selektion auftreten. Darüber hinaus kann jede Mutation mit zunehmender Häufigkeit infolge eines zufälligen genetischen Drifts auftreten. Wenn ein Allel eine bestimmte Häufigkeit in einer Spezies erreicht (mindestens 1 %), wird es als „Polymorphismus“ (SNP) bezeichnet, andernfalls als einzelne Nukleotid-„Mutation“ (HARTL & CLARK, 2007). Des Weiteren unterscheidet man zwischen „natürlichen Polymorphismen“ (intrinsisch) und „adaptiven Mutationen“, wie beispielsweise Medikamentenresistenzen. Natürliche Polymorphismen können aus bereits bestehenden Variationen hervorgehen (genomische Vielfalt), während adaptive Mutationen „*de-novo*“ erworbene Veränderungen auf einen bestimmten selektiven Druck sind (z. B. die Exposition gegenüber Antibiotika). Allerdings ist eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Arten von Mutationen nicht immer einfach (HARTL & CLARK, 2007). Beispielsweise ist die Resistenz von *M. bovis* gegen Pyrazinamid aufgrund einer Aminosäureänderung im *pncA*-Gen (Rv2043c) auf eine natürliche Mutation zurückzuführen, da sie bereits vor der Pyrazinamid-

Einführung vorhanden war und in allen *M.-bovis*-Stämmen gleichermaßen vorhanden ist (HARTL & CLARK, 2007). Eine erworbene Mutation hingegen wird durch einzelne chromosomale Nukleotidmutationen im Genom einiger weniger Vertreter verursacht oder kann durch horizontalen Gentransfer auftreten.

Auf eine Unterscheidung zwischen „natürlichen“ und „adaptiven“ SNPs wird im weiteren Verlauf dieser Dissertation verzichtet, und der Einfachheit halber werden einzelne Nukleotidvarianten unter dem Begriff „SNPs“ zusammengefasst.

SNPs sind relativ seltene Ereignisse im MTC. Sie treten etwa alle 3 kb in einer DNA-Sequenz auf (COMAS et al., 2010). Interessanterweise ist die Mehrheit der SNPs im MTC „singletons“ d.h. eine Variation, die nur in einem einzigen Stamm auftritt. Als mögliche Erklärung wird die positive Wirkung von Hintergrundselektionen genannt (HERSHBERG et al., 2008; PEPPERELL et al., 2010). SNPs können, abhängig von ihrer Position im Genom, entweder kodiert oder nicht-kodiert sein. Mit einer Kodierungsdichte von 90 – 96 % sind die meisten der SNPs im MTC in kodierenden Regionen des Genoms lokalisiert (NAMOUCHI et al., 2012). Kodierende SNPs können in „synonyme“ (sSNP) und „nicht-synonyme“ (nSNP) weiter unterteilt werden, je nachdem, ob sie zu einer Aminosäuresequenz-Änderung führen oder nicht. Synonyme SNPs werden auch als stille („silent“) Mutationen bezeichnet und haben keinen signifikanten Einfluss auf den Phänotyp. Im MTC sind etwa zwei Drittel der SNPs in kodierenden Regionen nicht-synonym (FLEISCHMANN et al., 2002; HERSHBERG et al., 2008). Die Mehrheit der nSNPs haben eine stärkere Wirkung auf den Phänotyp und die Fitness des Organismus (entweder vorteilhaft oder schädlich) und stehen daher unter einem stärkeren selektiven Druck als sSNPs (COSCOLLA & GAGNEUX, 2014). Hershberg et al. beobachteten, dass 58 % der nicht-synonymen SNPs im Genom auftreten, die in anderen Mykobakterien hoch konserviert waren, was darauf hindeutet, dass die meisten dieser Mutationen im MTC funktionelle Konsequenzen haben könnten (HERSHBERG et al., 2008). Nicht-synonyme SNPs können auch zu epigenetischen Veränderungen führen. Beispielsweise ein nicht-synonymes SNP in der Methyltransferase *mamA* und ein anderes nicht-synonymes SNP in der aktiven Stelle von *hsdM* führte zu einer Variation der Adeninmethylierung in *M.-tuberculosis*-Stämmen (SHELL et al., 2013). Die relativ geringe Anzahl an SNPs und der begrenzte horizontale Gentransfer im MTC (KRZYWINSKA et al., 2004; GAGNEUX et al., 2006; VEYRIER et al., 2009; SMITH, et al., 2013) führt zu einem geringen Homoplasie-Niveau, d.h. dem unabhängigen Auftreten ein und derselben SNPs in phylogenetisch nicht verwandten Stämmen (HERSHBERG et al., 2008; COMAS et al., 2010).

### 3.6 SNP assoziierte Resistenzen und Differenzierung im MTC

Chromosomale einzelne Nukleotidmutationen können aufgrund der klonalen Natur des MTC als Resistenz-Marker verwendet werden. Im MTC sind keine Resistenzplasmide (R-Plasmide) oder Transposonelemente beschrieben worden, und ein horizontaler Gentransfer existiert nicht (GAGNEUX et al., 2006; SMITH et al., 2013) oder nur sehr unregelmäßig (KRZYWINSKA et al., 2004; VEYRIER et al., 2009; SUPPLY et al., 2013). In diversen Datenbanken sind zahlreiche Mutationen in Genen von *M. tuberculosis* zusammengefasst, die mit einer Antibiotika-Resistenz in Zusammenhang stehen (WANG et al., 2007). Beispielsweise führen die Mutationen im *katG*-Gen zur Resistenz gegen Isoniazid, *rpoB* gegen Rifampicin, und eine Ethambutol-Resistenz ist auf eine Mutation im *embB* zurückzuführen (SANDGREN et al., 2009). In Tabelle 3 sind die Gene von *M. tuberculosis* nach Smith et al. zusammengefasst, in denen Mutationen mit einer Medikamentenresistenz in Zusammenhang stehen (SMITH et al., 2013). Die Differenzierung des MTC mit Hilfe von SNPs ist im Abschnitt 5.3.7 genauer beschrieben.

**Tabelle 3: Für Antibiotika-Resistenzen verantwortliche Gene in *M. tuberculosis***

Resistenz gegenüber	Genort	Genfunktion
Isoniazid	<i>katG</i>	Katalase-Peroxidase
	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP-Reduktase
	<i>ndh</i>	NADH-Dehydrogenase II
	<i>ahpC</i>	Alkyl-Hydroxid-Peroxidase
Rifampicin	<i>rpoB</i>	β-Untereinheit der RNA-Polymerase
Pyrazinamid	<i>pncA</i>	Pyrazinamidase
	<i>rspA</i>	ribosomales-Protein S1
Ethambutol	<i>embCAB</i>	Arabionsyl-Transferase
	<i>embR</i>	<i>embCAB</i> -Transkriptions-Regulator
Streptomycin	<i>rpsL</i>	ribosomales-Protein S12
	<i>rrs</i>	16S rRNA
	<i>gidB</i>	16S rRNA Methyl-Transferase
Amikacin/Kanamycin	<i>rrs</i>	16S rRNA
	<i>eis</i>	Acetyl-Transferase
Ethionamid	<i>ethA</i>	Flavin-Monooxygenase
	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP-Reduktase
	<i>ethR</i>	<i>ethA</i> -Transkriptions-Repressor
	<i>ndh</i>	NADH-Dehydrogenase II
	<i>mshA</i>	Glykosyl-Transferase
Fluorchinolone	<i>gyrA</i>	DNA-Gyrase-A
	<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase-B

### 3.7 Charakteristische SNPs von *Mycobacterium caprae* und *Mycobacterium bovis*

SNP-Analysen haben gezeigt, dass sie für einige charakteristische Merkmale der Tuberkuloseerreger verantwortlich sind und zur Differenzierung des MTC verwendet werden können (Abschnitt 5.3.7). Die Punktmutation im Pyrazinamidase- (*pncA*) Gen (Rv2043c) in *M. bovis* unterscheidet die Spezies von allen anderen Mitgliedern des MTC und ist für die natürliche Resistenz gegen Pyrazinamide verantwortlich (Tabelle 4) (ESPINOSA et al., 1998; ARANAZ et al., 2003; HARTL & CLARK, 2007).

**Tabelle 4: Charakteristische SNPs von *M. caprae* und *M. bovis* zur Spezies-differenzierung**

Gen	Position	SNP	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	andere Spezies des MTC	spezifisch für
<i>pncA</i>	169	C zu G	-	+	-	<i>M. bovis</i>
<i>oxyR</i>	285	G zu A	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
<i>gyrB</i>	756	G zu A	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
	1311	T zu G	+	-	-	<i>M. caprae</i>
	1410	C zu T	-	+	-	<i>M. bovis</i>
	1450	G zu T	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
<i>lepA</i>	690	C zu T	+	-	-	<i>M. caprae</i>

T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, + SNP ist vorhanden, - SNP ist nicht vorhanden, Abbildung und Angaben nach Domogalla (DOMOGALLA, 2014)

Für *M. caprae*-speziestypische SNPs sind für das *oxyR*-Gen (ESPINOSA et al., 1998; BROSCHE et al., 2002), das *gyrB*-Gen (KASAI et al., 2000; NIEMANN et al., 2000) und der Elongationsfaktor *lepA* beschrieben worden (REDDINGTON et al., 2011). Die Punktmutation im Gen der *oxyR*, die im Rahmen der oxidativen Stressantwort als putativer Regulator der Alkaly-Hydroperoxid-Reduktase fungiert, dient neben *M. caprae* auch bei *M. bovis* als Unterscheidungsmerkmal zum MTC (ESPINOSA et al., 1998; BROSCHE et al., 2002). Jedoch handelt es sich beim *oxyR*-Gen um ein Pseudogen und der SNP im *oxyR*-Gen gilt als stumme Mutation (ESPINOSA et al., 1998). Das *gyrB*-Gen codiert die  $\beta$ -Untereinheit der DNA-Gyrase (Topoisomerase-II), ein Enzym, das wesentlich für die mykobakterielle Replikation verantwortlich ist (KASAI et al., 2000; CHIMARA et al., 2004), und dieser

Sequenzpolymorphismus im *gyrB*-Gen dient unter anderem im Geno-Type-MTBC-Testsystem (Abschnitt 5.3.2) (RICHTER et al., 2003) zur Differenzierung zwischen MTC-Erregern aus Kulturmateriel (KASAI et al., 2000; NIEMANN et al., 2000; ARNOLD et al., 2005; DJELOUADJI et al., 2008). Im Elongationsfaktor, der durch das *lepA*-Gen codiert wird und eine Nukleotidsequenzlänge von 1962 bp aufweist, wurde ein *M. caprae*-spezifischer SNP detektiert (Tabelle 4) (REDDINGTON et al., 2011).

### 3.8 Virulenz Strategien der MTC-Spezies

Prinzipiell beruhen die Pathogenität von *M. tuberculosis* sowie die von *M. bovis* auf dem Zusammenspiel zahlreicher Virulenzfaktoren. Tuberkuloseerreger nutzen mehrere Strategien, um dem antimikrobiellen Abwehrsystem zu entkommen, in Makrophagen zu überleben und sich vermehren zu können (PIETERS 2008; ZAHRT 2003). Dabei spielen neben der lipidreichen Zellwand und deren Komponenten (Abschnitt 2.2.) auch zahlreiche Enzyme und sekretorische Proteine eine zentrale Rolle. Toll-ähnliche-Rezeptor-(TLR) Liganden können eine Makrophagenaktivierung bewirken und somit einer Infektion entgegenwirken. Jedoch wird die Phagosomreifung im Makrophagen durch Signale der TLR-Adapterproteine (*MyD88* und *p38*) reguliert, und diese TLR-Signalisierung kann durch Mykobakterien negativ beeinflusst werden und somit die Phagosomreifung unterbinden (FRATTI et al., 2003; VERGNE et al., 2004; BLANDER & MEDZHITOV, 2006; KINCHEN & RAVICHANDRAN, 2008). Neben der Unterbindung der Phagosom-Reifung können Mykobakterien die Fusion von Phagosom und Lysosom hemmen. Die Verschmelzung des Phagosom-Lysosom-Komplexes wird durch Blockierung einer Wirtsmembrankomponente PI3P (Phosphatidylinositol-3-phosphat), die essentiell für die Phagolysosomenbiosynthese ist, gestört. Sobald *M. tuberculosis* sich im Phagosom befindet, leitet das Bakterium die Phosphatase- (*SapM*) und Serin/Threonin-Kinase- (*PknG*) Bildung ein, um die Phagosom-Lysosom-Fusion und die Phagozytose so zu verhindern (WALBURGER et al., 2004; VERGNE et al., 2005; PIETERS 2008).

Auch spezielle Gene, die für Stress-Proteine kodieren, wie *katG* (Schutz der Katalase-Peroxidase-Aktivität vor einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Wirkung) oder *sodC* (Schutz vor toxischen Wirkungen des durch aktivierte Makrophagen gebildeten Superoxid) (PIDDINGTON et al., 2001), können den Erreger vor intrazellulärem oxidativen Stressmolekülen schützen (CHAN et al., 1991; PIDDINGTON et al., 2001; WU et al., 2009) und die Invasion in die Wirtszelle erleichtern (COLE et al., 1998). Auch Gene, die für die Expression und Regulation wichtiger

Zellwand-Biosynthese-Gene zuständig sind, wie *phoP* (Transkriptionsaktivierung der Lipidbiosynthese), *ilvD* (Transkriptionsaktivierung der Aminosäure-Biosynthese), *pks12* (Synthese und Transport von Polyketiden) (SIRAKOVA et al., 2003; GARNIER et al., 2003) und *nrp* (Transkriptionsaktivierung der Polyketid-Biosynthese) (HOTTER et al., 2005; ZHENG et al., 2008) können zugunsten des Erregers beeinflusst werden.

Zahlreiche Experimente in *M. tuberculosis* zeigten auch, dass Gene mit Mutationen in der Promotorsequenz die Transkription von weiteren Genen beeinflussen, die für den Energiemetabolismus (*lpdA-glpD2*) (ARGYROU et al., 2004), für die Cofaktor-Biosynthese (*pabB*) (CUCCUI et al., 2007), den Nukleotid-Metabolismus (*nrdH/nrdE/nrdF2*) (DAWES et al., 2003), den Lipid-Stoffwechsel (*phoH2*) (KAZAKOV et al., 2003), den Proteinabbau (*ftsH*) (ITO & AKIYAMA, 2005) und die globalen Transkriptionsfaktoren, wie Sigma-Faktoren (*sigC*) verantwortlich sind (SUN et al., 2004; KARLS et al., 2006) und damit zur Virulenz der MTC-Mitglieder beitragen (GARNIER et al., 2003; ZHENG et al., 2008).

Die granulomatöse Entzündungsreaktion ist eine wichtige Folge der zellulären Immunabwehr, die auf die Aktivierung von Makrophagen durch T-Zellen zurückgeht. Es kommt zu einem Wechselspiel zwischen T-Lymphozyten, MHC (major histocompatibility complex) - vermittelter Antigenpräsentation und den Zytokinen Interferon- $\gamma$  und Tumor-Nekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ). Während einer Tuberkuloseinfektion spielen sogenannte CD1b-Moleküle, die für die Präsentation der Lipid-Antigene und Erkennung durch T-Zellen verantwortlich sind, eine wichtige Rolle. CD1 präsentiert aber auch die für die Virulenz verantwortlichen Zellwandkomponenten, wie z.B. Lipoarabinomannan und Phosphatidylinositol-Mannoside (JULLIEN et al., 1997). Die Erkennung durch T-Helferzellen führt zur Produktion von Interleukinen, z.B. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), welche Makrophagen zur Reifung und Abwehrsteigerung aktivieren. Zytotoxische T-Lymphozyten lysieren die infizierten Makrophagen, wodurch der Tuberkuloseerreger aus den Makrophagen freigesetzt wird (HEROLD, 2012; SILVA-MIRANDA et al., 2012). Hierbei sind die Hauptvirulenzfaktoren Proteine bzw. Enzyme, die der Erregerausbreitung im Wirtsorganismus dienen. Die kodierenden Gene dafür sind bei *M. tuberculosis* in der RD1-Region lokalisiert und gehören zu einem umfassenden Sekretionssystem (ESX-1-Locus), welches für die Sekretion der Virulenzfaktoren ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target) und CFP-10 (10-kDa culture filtrate antigen) zuständig ist (STOOP et al., 2011). Die ESAT-6-Familie ist eine Gruppe von 20 bekannten Antigenen in *M. tuberculosis*, die in *M. bovis* verändert oder deletiert sind. Das ESAT-6 Protein gehört neben CFP-10 und CFP-7 zur Gruppe der T-Zell-

Antigene, die miteinander in Wechselwirkung stehen und eine wichtige Rolle für die Pathogenese und Virulenz bei MTC-Spezies spielen (RENSHAW et al., 2002). ESAT-6 und CFP-10 unterstützen die Produktion des Tumornekrosefaktors (TNF- $\alpha$ ), welcher wiederum Apoptose und Nekrose von infizierten Makrophagen induzieren kann und die Translokation der Mykobakterien vom Phagosom ins Zytosol und deren intrazelluläre Ausbreitung ermöglicht (GAO et al., 2004; STOOPE et al., 2011). Des Weiteren moduliert die regulatorische Funktion von ESAT-6 und CFP-10 zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten den Zelltod von Makrophagen (GUO et al., 2012). In *M. bovis* sind jedoch sechs der ESAT-6-Proteine, die in *M. tuberculosis* durch Rv2346c, Rv2347c, Rv3619c, Rv3620c, Rv3890c (*Mb3919c*) und Rv3905c (*Mb3935c*) codiert werden, verändert oder deletiert (GARNIER et al., 2003). So führt dieser Genverlust im ESX-1-Operon zu einer geringeren Transkriptionsrate und damit niedrigeren Expression des ESX-1-Sekretionssystems in *M. bovis* (HUNT et al., 2012; CAO et al., 2015). In *M. bovis* BCG und allen attenuierten Impfstämmen ist die komplette RD1-Region mit dem Sekretionssystem deletiert (MAHAIRAS et al., 1996; LEWIS et al., 2003).

Die Analyse des ESX-Sekretionssystems (mit den Genen *Ecc*, *Esx* und *Esp* als Hauptkomponenten im ESX-1, ESX-2, ESX-3 und/oder ESX-5-Locus KUNNATH-VELAYUDHAN & PORCELLI, 2013) durch La Fuente et al. zeigte eine ESX-3 Deletion und die Aufrechterhaltung des ESX-1 *Esp*-Gens in *M. caprae*. Die ESX-3 Deletion wird mit hohen Läsionswerten in Zusammenhang gebracht und kann die Lebensfähigkeit von *M. caprae* beeinflussen, jedoch könnte sie auch wirtsspezifisch wirksam sein (LA FUENTE et al., 2015 a). Die antigen-spezifischen CD4-T-Zellen, die für die Immunantwort des Wirts essentiell sind, werden in *M. tuberculosis* hauptsächlich durch Proteine des ESX-3-Locus induziert (KUNNATH-VELAYUDHAN & PORCELLI, 2013). Aufgrund der *M. caprae*-spezifischen Deletion im ESX-3-Locus, ist die Menge an induzierten T-Zellen in *M. caprae* geringer. Die verminderte Wirtsimmunreaktion führt zu erhöhten Läsionswerten und erleichtert eine chronische Infektion. Ferner wurde gezeigt, dass in *M. caprae* die Gene, welche die Stressantwort mit dem Lipidstoffwechsel verknüpfen, hoch konserviert vorliegen (LA FUENTE et al., 2015 a).

Neben der angeborenen Immunantwort (natürliche Abwehrlage), die genetisch bestimmt und individuell verschieden ist (HEROLD, 2012), ist auch die erworbene (adaptive) Immunantwort (zelluläre Immunität) wichtig. Tuberkuloseerreger beeinflussen die Antigen-präsentierenden Zellen, welche für die Aktivierung der erworbenen Immunantwort wichtig

sind, die nach einer mykobakteriellen Infektion vorwiegend durch T-Lymphozyten repräsentiert werden (TAILLEUX et al., 2003; SILVA-MIRANDA et al., 2012).

Des Weiteren zeigen die für PE-PGRS- und PPE-Proteinfamilien codierenden Gene große Sequenzvariationen (COLE et al., 1998). Deren Rolle als oberflächenexponierte Proteine wurde im Zusammenhang mit der Adhäsion und Immunmodulation diskutiert (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; BANU et al., 2002). Zwischen *M. bovis* AF2122/97 und *M. tuberculosis* H37Rv gibt es zahlreiche Sequenzvariationen, die aus In-Frame-Insertionen und Deletionen entstanden sind und für 29 verschiedene PE-PGRS und 28 PPE-Proteine codieren. Diese Genfamilien (Proteine) mit ihren umfassenden Sequenzpolymorphismen bieten eine Quelle an Variationen auf selektiven Druck. Das PE-PGRS-Protein (Rv1759c) in *M. tuberculosis* bindet Fibronectin und beeinflusst somit den Wirts- oder Gewebetropismus (ESPITIA et al., 1999). Das *M.-bovis*-Ortholog von Rv1759c ist ein Pseudogen (GARNIER et al., 2003).

### **3.9 Manifestation von humanen *Mycobacterium-caprae*-Infektionen**

Die Manifestation der durch *M. caprae* verursachten humanen Tuberkuloseinfektion ist vielfältig, und es wurden bereits verschiedene Formen beschrieben. Am häufigsten tritt die Hauttuberkulose (Lupus vulgaris) auf. Diese Form der Tuberkulose wurde in Süddeutschland und der Türkei nachgewiesen, und *M. caprae* konnte als Erreger isoliert werden. Als Infektionsursache wurde der Kontakt zu Rindern und der Konsum von Rohmilchprodukten genannt (MEYER et al., 2005; TAR et al., 2009). Vereinzelte pulmonale und extrapulmonale *M.-caprae*-Tuberkulosefälle sind in Europa in Österreich (PRODINGER et al., 2014), Deutschland (KUBICA et al., 2003), Spanien (RODRIGUEZ et al., 2009) und Frankreich (AIME et al., 2012) aufgetreten. Aber auch außerhalb Europas sind in Marokko (LAHLOU et al., 2012), Algerien, Tunesien (PRODINGER et al., 2014) Israel, Nigeria, Kenia und Peru *M.-caprae*-Fälle gemeldet worden (BLAAS et al., 2003; SINTCHENKO et al., 2006). Erst kürzlich wurde die Diagnose einer Peritoneal-Tuberkulose veröffentlicht, die auf *M. caprae* zurückzuführen war. Ein zuvor gesunder 41-jähriger Marokkaner, der viele Jahre in Spanien verbracht hatte, kam nach 6-monatiger Beschwerdezeit (Bauchschmerzen, Gewichtsverlust, Müdigkeit und Durchfall) zur Untersuchung. Er lebte in einer Vorstadt, arbeitete als Elektriker und hatte keinen Kontakt zu Tieren, auch der Konsum von nicht-pasteurisierten Milchprodukten konnte verneint werden (NEBREDA et al., 2016). Als Erreger der tuberkulösen Meningitis wurde *M. caprae* bei einem Fall in Süddeutschland bei einem 80-jährigen Mann veröffentlicht. Eine Verbindung zur Landwirtschaft konnte nicht hergestellt



werden (HANSEN et al., 2012). Auch eine perinatale Tuberkuloseerkrankung mit *M. caprae* wurde bei einem acht Wochen alten Säugling aus Nigeria veröffentlicht. Die Anamnese der Mutter deutete auf eine vor elf Jahren stattgehabte Tuberkuloseinfektion hin, die sich durch eine tuberkulöse Peritonitis und einen positiven Tuberkulin-Hauttest äußerte (BENAVIDES-NIETO et al., 2016).

## **4 Die Rindertuberkulose**

### **4.1 Die Tuberkulose beim Rind damals**

Die ersten Beschreibungen der Rindertuberkulose (bTB), auch „Perlsucht“ (wurde seit dem 16. Jahrhundert eine Zeit lang als eine Form der Syphilis angesehen), „Hirsesucht“ oder „Franzosenkrankheit“ genannt, findet man bereits im 12. Jahrhundert (HUNERMUND & KROPP, 2006). Nachdem Robert Koch 1882 den Tuberkelbacillus entdeckt hatte, konnte bereits 1898 Theobald Smith zeigen, dass Tuberkelbazillen von Menschen und von Rindern nicht gleichartig sind und eine sehr unterschiedliche Virulenz bei Rindern, Kaninchen und Meerschweinchen haben. Smith unterschied zwischen zwei Formen von *Bacillus tuberculosis mammalium*: den Typus humanus und den Typus bovinus (HEDVALL, 1957). Im Rahmen seiner jahrelangen Tuberkuloseforschungen konnte Robert Koch dann 1901 die tuberkulöse Ätiologie der Rindertuberkulose aufdecken und berichtete, dass die humane und bovine Tuberkulose keineswegs identisch sind. Des Weiteren behauptete Koch fälschlicherweise, dass eine Ansteckung der bovinen Tuberkulose auf den Menschen und umgekehrt nicht möglich sei und dass die schädliche Wirkung der Perlsuchtmilch auf den Menschen nicht erwiesen und eine Schutzmaßnahme nicht erforderlich sei (HEDVALL, 1957; HUNERMUND & KROPP, 2006). Die Aufhebung des Verbotes der Nutzung von an der „Franzosenkrankheit“ leidenden Rindern zum einen (HIRSCHWALD, 1875) und die Unterschätzung der Infektionskrankheit und der sorglose Umgang aufgrund der Fehlinterpretation Kochs zum anderen, begünstigte die Ausbreitung der Rindertuberkulose Ende des 19. Jahrhunderts stark (DEN-DRIESCH & PETERS, 2003). So wurde das Fleisch tuberkulöser Rinder anstandslos verzehrt, Rohmilch und Rohmilchprodukte konsumiert und teils verseuchte Milch als „Kindermilch“ verkauft (daraus entstand der Spruch „Rindertuberkulose = Kindertuberkulose“), und infolgedessen nahm die Tuberkuloseverseuchung stetig zu. In einer Veröffentlichung von Savage im Jahre 1937 waren in Deutschland etwa 13,5 Prozent aller Tuberkulosedodesfälle beim Menschen durch bovine Tuberkelbazillen verursacht worden. Die Lungentuberkulose war hierbei weniger

häufig vertreten, hingegen betraf die Mehrzahl Drüsen- und Hauttuberkulose, gefolgt von Knochentuberkulose, Meningealtuberkulose und Urogenitaltuberkulose (HEDVALL, 1943). Noch bis weit ins 20. Jahrhundert hinein war die Rindertuberkulose keine Seltenheit und in Deutschland waren etwa 30 bis 35 % der Rinder und mehr als 50 % der Milchkuhbestände Tuberkulose-infiziert (Beer, 1980). Besonders von der Krankheit betroffen waren die Staaten West- und Mitteleuropas durch ihre intensive Milchwirtschaft, und Deutschland gehörte zu den am schlimmsten befallenen Ländern (FISCHER, 1985). Auch wurde vor dem Zweiten Weltkrieg der Bedarf an tierischem Eiweiß durch den Verzehr von Rindfleisch gedeckt, und infolgedessen nahm mit der Entwicklung der Intensivlandwirtschaft der Rinderbestand in Deutschland stetig zu. Die Verbreitung der Rindertuberkulose wurde durch die konventionelle Haltung der Rinder (viele Rinder auf kleinem Raum, Stallfütterung, schnelle Aufzucht und zunehmender Tierhandel) begünstigt. In Gebieten mit ausgedehntem Weideland wie in Nordamerika, in Zentralafrika oder auf Inseln war die Rindertuberkulose nahezu unbekannt (DAVIES et al., 2014). Bereits 1892 wurde in Dänemark ein Kontrollprogramm nach Bang eingeführt zur erfolgreichen Bekämpfung der Seuche bei Mensch und Tier, indem jedes Rind mittels Tuberkulin Hauttest getestet wurde. Nachdem in Deutschland ein von Robert von Ostertag 1912 zunächst freiwilliges Bekämpfungsverfahren (Aussonderung klinisch auffälliger Rinder) nicht den erwünschten Erfolg gebracht hatte, da nur Rinder mit einer klinisch erkennbaren Tuberkulose erfasst worden waren (OSTERTAG, 1913), begann man im Jahr 1952 ebenfalls mit der staatlich anerkannten „Bang’schen Methode“ die Rindertuberkulose zu tilgen (DEN-DRIESCH & PETERS, 2003). Durch die systematische Bekämpfung der Rindertuberkulose erreichte man eine Zunahme der Tuberkulose-freien Ställe von 9,9 % im Jahr 1952 auf 99,7 % im Jahr 1961 (DAVIES et al., 2014). Mit der Pionierarbeit der Pasteurisierung (kurzzeitiges Erhitzen auf 72°–75° C) von Louis Pasteur und Franz von Soxhlet im Jahr 1900 und deren standardmäßiger Anwendung seit 1947 bei Milch und Milchprodukten (HUNERMUND & KROPP, 2006), zusammen mit der konsequenten Bekämpfung der Tuberkulose in Viehbeständen durch die jährliche Tuberkulin-Testung, erlangte man auch eine drastische Reduktion der zoonotischen humanen Tuberkuloseinfektionen in Deutschland. Die durch *M. bovis* oder *M. caprae* verursachte humane Rindertuberkulose ist in den entwickelten Ländern, aufgrund von Tuberkulose-Tilgungsprogrammen und Verordnungen für domestizierte Tiere mit dem Ziel, eine Tuberkuloserate von weniger als 1 % zu erhalten, sehr selten geworden (MICHEL et al., 2010; TORGERSON & TORGERSON, 2010), hingegen sind vor allem die Entwicklungsländer Afrikas und Asiens, sowie einige Staaten der ehemaligen Sowjetunion

noch immer von der Rindertuberkulose stark betroffen (COSIVI et al., 1998; AYELE et al., 2004; MULLER et al., 2013). Eine „Tuberkulose-Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes“ regelt in der Fassung der Bekanntmachung vom 13. März 1997 (BGBl. IS. 462) in der jeweils geltenden Fassung seither die Tuberkulosebekämpfung in Rinderbeständen. Die Rindertuberkulose unterliegt seit 1965 in Deutschland nach §1 der „Verordnung der anzeigepflichtigen Tierkrankheiten“ der Anzeigepflicht und gilt auf Grund intensiver staatlicher Bekämpfungsverfahren als praktisch getilgt.

## 4.2 Aktuelle Tuberkulosebekämpfung beim Rind in Deutschland

Seit dem 1. Januar 1997 ist die Bundesrepublik Deutschland aufgrund der EU Entscheidung 97/76/EG, ersetzt durch EU Entscheidung 99/467/EG, offiziell anerkannt als frei von Rindertuberkulose (OTF: officially free of bovine tuberculosis). Dies bedeutet, dass mindestens 99,9 % der Rinderbestände in jedem Jahr und in den jeweils zurückliegenden zehn Jahren, amtlich anerkannt frei von Tuberkulose sind (MOSER & SIRIMALAISUWAN, 2004). Seither wird die Tuberkuloseüberwachung geschlachteter Rinder über die amtliche Fleischuntersuchung sichergestellt, und die turnusmäßige, flächendeckende Tuberkulinisierung der Rinder wurde eingestellt („Verordnung zum Schutz vor Rindertuberkulose“, 1997; abgeändert in der „Verordnung zur Änderung der Tuberkulose-Verordnung und weiterer tierseuchenrechtlicher Vorschriften“, 2009). Am 12.07.2013 ist eine Neufassung der Tuberkulose-Verordnung in Kraft getreten, nach der neben der Fleischuntersuchung ein ergänzendes Monitoring mit Hilfe des Hauttests (Simultantest) bei 24 Monate alten weiblichen Rindern nach §2a erforderlich ist. Es kommt immer wieder vor, dass sich Rinder durch den Kontakt zu infizierten Wildtieren mit Tuberkulose infizieren (PALMER, 2013; FITZGERALD & KANEENE, 2013; FINK et al., 2015). In den letzten Jahren wurden in Bayern, insbesondere im Allgäu, wieder verstärkt Ausbrüche von Rindertuberkulose festgestellt, und auch beim Rotwild in den bayerischen Alpenregionen konnte *M. caprae* nachgewiesen werden (MOSER et al., 2014), dennoch liegt bundesweit der Anteil der bTB-betroffenen Betriebe mit positivem Tuberkulose-Nachweis weit unterhalb des gegenwärtig festgelegten Grenzwertes von 0,1 %. Das Tierseuchen-Informationen-System (TSIS) ist ein öffentlich zugängliches Datensystem, welches alle anzeigepflichtigen Tierseuchen aufzeigt, die durch das Tierseuchennachrichten-System (TNS) der Veterinärämter erfasst werden. In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die in Deutschland und Bayern angezeigten Rindertuberkulosefälle (*M. caprae* und *M. bovis*) im Zeitraum vom 01.01.2000 bis 31.12.2016 aus dem TSIS aufgezeigt. (Abfragedatum 31.12.2016).

**Tabelle 5: Von 2000 bis 2016 angezeigte, durch *M. bovis* und *M. caprae* verursachte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Rinderbeständen in Deutschland und Bayern**

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Deutschland	4	4	6	9	10	5	5	12	23	23	11	5	23	46	13	12	2
Bayern	2	2	2	1	5	3	2	7	8	18	5	2	19	34	9	8	2

Datenerfassungszeitraum 2000 bis 31.12.2016; Datenquelle: TSIS, Abfragedatum 31.12.2016

Nach der Nomenklatur-Änderung von *M. bovis* spp. *caprae* zu *M. caprae* im Jahr 2003 (ARANAZ et al., 2003) gilt *M. caprae* als eigenständige Spezies und wird im Tierseuchennachrichten-System (TSN) seit 10.11.2004 als anzeigepflichtige Tierkrankheit getrennt erfasst. Das Vorkommen von *M. caprae* und *M. bovis* als Erreger der Rindertuberkulose zeigt in Deutschland eine weitgehend getrennte Situation auf. In der nördlichen Hälfte (inkl. Niedersachsen) wird überwiegend *M. bovis* identifiziert, in der südlichen Hälfte, insbesondere in Bayern, wird die Rindertuberkulose meist ausschließlich durch *M. caprae* hervorgerufen. Eine hohe Frequenz an *M.-caprae*-Ausbrüchen bei Rind und Rotwild war in den letzten Jahren, speziell im Allgäu (Landkreis Oberallgäu, gefolgt von Ostallgäu, Lindau und Unterallgäu) und in den angrenzenden Regionen in Österreich, zu verzeichnen. Aus diesem Grund wurde im Oktober 2007 mit einer flächendeckenden Tuberkuloseuntersuchung bei Rindern in den Landkreisen Lindau, Ostallgäu, Oberallgäu, Unterallgäu und den darin liegenden kreisfreien Städten Kaufbeuren, Kempten und Memmingen begonnen. Alle Rinder ab einem Alter von drei Jahren wurden mit Hilfe des Intrakutan-Tests auf Rindertuberkulose untersucht (LGL, 2011). Beim Auftreten von *M.-caprae*-positiven Rindern außerhalb Bayerns war meist ein Kontakt zu bayerischen Betrieben nachweisbar (MOSER et al., 2014). Das Vorkommen von *M. caprae* in Bayern scheint eng im Zusammenhang mit dem Vorkommen dieses Erregers bei Rindern und Rotwild in Österreich zu stehen (FINK et al., 2015). Die ungleiche Nord-Süd-Verteilung von *M. caprae* und *M. bovis* in Deutschland ist auch bei den humanen Rindertuberkulosefällen erkennbar (KUBICA et al., 2003). Dieses Nord-Süd-Gefälle bezüglich des Vorkommens der Tuberkuloseerreger zeigt sich auch außerhalb Deutschlands. In den nordeuropäischen Ländern, insbesondere in Großbritannien und Irland, ist *M. caprae* eher unbekannt, während in Österreich, Italien, Spanien und im Südosten von Europa meist ausnahmslos *M. caprae* nachgewiesen wird (PRODINGER et al., 2005). Die zoonotische Tuberkulose des Menschen

wird in Österreich hauptsächlich durch *M. caprae* hervorgerufen, während *M. bovis* in Österreich beim Rind, Rotwild und Menschen nahezu unbekannt ist (MOSER et al., 2014).

### 4.3 Die Rindertuberkulose als Zoonose

Die Rindertuberkulose (bTB) ist nicht nur eine ansteckende Infektionskrankheit der Rinder und anderer Wiederkäuer, sondern kann auch den Menschen befallen. Als Verursacher der Rindertuberkulose sind die klassischen Erreger *M. bovis* und *M. caprae* auch beim Menschen zu nennen. *M. tuberculosis* ist der häufigste Verursacher der humanen Tuberkulose, jedoch können auch andere Mitglieder des MTC schwerwiegende Erkrankungen beim Mensch verursachen (PRODINGER et al., 2002). Die Tuberkulose ist eine Zoonose und aufgrund des weiten Wirtsspektrums der humanen und tierpathogenen Tuberkuloseerreger zwischen Mensch und Tier wechselseitig übertragbar (MCDANIEL et al., 2014). Obwohl eine *M. tuberculosis*-Übertragung vom Mensch auf das Rind eher selten zu finden ist und als Folge meist lediglich von einer Tuberkulin-Positivität mit örtlicher Veränderung an der Injektionsstelle beim Rind berichtet wurde, sind Fälle einer Ansteckung des Rindes durch Menschen bekannt (HEDVALL, 1943; FRITSCHKE et al., 2004). Umgekehrt sind die bovinen Tuberkelbakterien (*M. bovis* und *M. caprae*) vom Rind weitaus häufiger für eine Tuberkuloseerkrankung des Menschen verantwortlich (THOEN et al., 2006). Die Übertragung der Rindertuberkulose von Mensch zu Mensch ist ebenfalls möglich (EVANS et al., 2007; MANDAL et al., 2011) und erst kürzlich bei Fällen aus Nebraska beschrieben worden (BUSS et al., 2016). Die Übertragung der Mykobakterien vom Rind auf den Menschen geschieht meist entweder durch den Konsum infizierter Lebensmittel, insbesondere von Rohmilch- und Rohmilchprodukten (MICHEL et al., 2010; MAJOOR et al., 2011) oder via Aerosol (z.B. Tröpfcheninfektion oder erregerrhaltiger Staub) bei einem engen Mensch-Tier-Kontakt, wie dies in der Landwirtschaft (TORRES-GONZALEZ et al., 2013) oder auch bei Mitarbeitern der Fleischindustrie oft der Fall ist (THOMPSON et al., 1993). Eine Ansteckung über Haut- bzw. Schleimhautläsionen beim Umgang mit tuberkulösen Rindern ist ebenfalls möglich (AGES, 2016). Bevor die standardmäßige Pasteurisierung von Milch und Milchprodukten im Jahr 1947 angewendet wurde, war *M. bovis* etwa für 6 % der Tuberkulose Todesfälle in Europa verantwortlich (COLE, 2002; AMANN-VESTI, 2006). Einem Bericht der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) ist zu entnehmen, dass der Erreger in der Milch bereits ausgeschieden werden kann, bevor klinische Auffälligkeiten festzustellen sind oder ein Tier durch den Tuberkulin-Test als infiziert hervorgeht (EFSA, 2006). Tiere, die keine sichtbaren Läsionen (NVL, non-visible lesions) haben, können sich

dennoch in einer frühen Phase der Infektion befinden, in der die Läsionen zu klein sind, um sie makroskopisch erkennen zu können (LA CORNER, 1994; GAVIER-WIDEN et al., 2009). Ferner werden sichtbare Läsionen nicht immer an Stellen entwickelt, die routinemäßig durch amtliche Fleischkontrollen am Schlachthof untersucht werden können (WHIPPLE et al., 1996) (geringe Sensitivität der Auffindung von ca. 30–50 % der infizierten Tiere mit sichtbaren Läsionen MOSER et al., 2014, CORNER et al., 1990) oder von Jägern in der Wildhegepraxis erkannt werden (GAVIER-WIDEN et al., 2009; O'BRIEN et al., 2004; O'BRIEN et al., 2008). Ein mögliches Tuberkuloserisiko für den Konsumenten durch den Verzehr von Produkten, die aus möglicherweise mit Tuberkelbakterien kontaminierter Milch hergestellt wurden wie z.B. Käse, erscheint zwar gering, kann aber nicht restlos ausgeschlossen werden (AGES, 2016). Analog dazu hält das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) das Risiko einer Infektion des Menschen durch den Verzehr von Käse aus mit Tuberkelbakterien kontaminierter Rohmilch in Abhängigkeit von der Käsesorte für sehr gering (BfR 2013). Auch durch den Verzehr von tuberkulösem Rind- oder Wildtierfleisch, speziell durch Roh-Fleischerzeugnisse, ist eine Übertragung der Rindertuberkulose auf den Menschen prinzipiell möglich (SAVOV, 1975; SHITAYE et al., 2009). Dies wird jedoch von der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) aufgrund routinemäßiger Schlacht tieruntersuchungen und im Anschluss durch Fleischuntersuchungen mit sehr geringem Risiko eingestuft. Insgesamt besteht derzeit für den Menschen in Deutschland ein geringes Risiko, sich mit der bovinen Tuberkulose zu infizieren. Jedoch bedarf es einer individuellen Betrachtung, da das Infektionsrisiko von der Erregerkonzentration und -Virulenz, sowie der Expositionsdauer und -intensität und letztlich der Resistenz des Wirtes abhängig ist (DIEL et al., 2011).

#### **4.4 Die Rinder-und Rotwildtuberkulose in Österreich**

Österreich ist seit dem Jahr 1999 amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose, und die flächendeckende Untersuchung der Rinder mit Hilfe des Intrakutan-Tests wurde im Jahr 2000 eingestellt. Derzeit basiert das nationale Überwachungsprogramm auf den gesetzlich vorgeschriebenen Schlacht tier- und Fleischuntersuchungen (SFU) (SCHOEPF et al., 2012). *M. bovis* konnte seit Erlangen der Tuberkulosefreiheit in Österreich kaum mehr nachgewiesen werden, jedoch werden seit 1999 in einigen Gebieten Tirols (oberes Lechtal im Bezirk Reutte) und Vorarlbergs (Bezirk Bludenz) immer wieder *M.-caprae*-Infektionen im Rind und Rotwild nachgewiesen (PRODINGER et al., 2002; SCHOEPF et al., 2012). Die Überpopulation im Schalenwild durch Nichteinhaltung des jagdrechtlich vorgeschriebenen Abschussplans wurde

als Hauptursache für das Tuberkuloseaufkommen im Rotwild festgestellt (AGES, 2015). Die Winter- bzw. Zusatzfütterungen des Wilds, der Zugang der Rinder zu den Wildfütterungsstellen während der Weidesaison und „gemeinsam genutzte“ Salzlecksteine und Tränkeeinrichtungen wurden als mögliche Kontaminationsstellen ermittelt und verschärfen den Infektionszyklus zusätzlich noch (MILLER & SWEENEY, 2013; BROOK et al., 2013; RIBEIRO-LIMA et al., 2016). Das inzwischen etablierte Reservoir der Wildtiertuberkulose in der dortigen Rotwildpopulation führte zusammen mit den überhöhten Rotwildbeständen zu einem hohen Infektionsdruck und war wesentlich an einer Tuberkuloseübertragung vom Rotwild auf das Rind und umgekehrt verantwortlich. Ein Erregeraustausch vom Rotwild auf das Rind durch die Nutzung der gleichen Weideflächen, insbesondere während der Weide- und Alpungsperiode, konnte seit 2008 beobachtet werden (FINK et al., 2015). Im Jahr 2008 wurde von der österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) ein Anstieg der Tuberkulosefälle bei Rindern durch *M. caprae* in Reutte, im Nordwesten Tirols und um die Ortschaft Steeg im Lechtal gemeldet. Eine angeordnete Tuberkuloseuntersuchung des Rotwilds in der Jagdsaison 2008/2009 ergab eine Prävalenz von bis zu 21,1 % entlang des Lechtals (SCHOEPP et al., 2010; 2012). In der Jagdsaison 2009/2010 wurde eine *M.-caprae*-Prävalenz im Rotwild von 23,1 % berechnet (FINK et al., 2015). Um die Tuberkulosesituation in den Rinderbeständen festzustellen, werden seit einigen Jahren in einzelnen Regionen Tirols (die Bezirke Reutte, Landeck, Imst und Innsbruck-Land) und Vorarlbergs sogenannte „Sonderuntersuchungsgebiete (§1 Abs. 4) und Sonderüberwachungsgebiete (§1 Abs. 5)“ amtlich ausgewiesen, in denen die Rinder nach der Alpungsperiode mittels Tuberkulosestest untersucht werden. In Tabelle 6 sind die festgestellten Rindertuberkulosefälle (*M. caprae*) in Tirol und Vorarlberg von 2008 bis 2015 zusammengefasst. Die flächendeckende bTB-Untersuchungsperiode dauert vom 01. November eines Jahres bis zum 30. April des Folgejahres. Es erfolgt eine Anpassung der Untersuchung an die epidemiologische Situation und gegebenenfalls eine entsprechende Gebietserweiterung (KVG, 2016).

**Tabelle 6: Angezeigte Rindertuberkulosefälle (*M.-caprae*-Infektionen) in Tirol und Vorarlberg in den Jahren 2008 bis 2015**

Jahr	Tirol (Bezirke Reutte, Landeck, Imst und Innsbruck-Land)	Vorarlberg
	Anzahl der <i>M.-caprae</i> - positiven Rinder	Anzahl der <i>M.-caprae</i> - positiven Rinder
2008	21	keine Untersuchungsaktion
2009	6	0
2010	6	3
2011	3	0
2012	25	0
2013	4	6
2014	3	8
2015	1	4

Datenquelle: VerbraucherInnen-Gesundheit des Bundesministeriums für Gesundheit (KVG, 2016)

In vielen Fällen der Feststellung boviner Tuberkulose in Betrieben konnte kein epidemiologischer Zusammenhang zu anderen Rinderbeständen hergestellt werden, und man schlussfolgerte einen Tuberkuloseeintrag aus der Rotwildpopulation (KOESSLER 2011). Um auch der Rindertuberkulose in den Rotwildbeständen der betroffenen Regionen entgegenwirken zu können, erließ man am 17. Juni 2011 in enger Zusammenarbeit mit der Jägerschaft und den betroffenen Behörden auf Landesebene eine Rotwild-TBC-Verordnung (Rotwild-TBC-Verordnung, BGBl. II Nr. 181/2011). Diese Rechtsgrundlage soll den Veterinärbehörden in den ausgewiesenen Risikogebieten entsprechende Bekämpfungs- und Überwachungsmaßnahmen durch Kontrollen der Wildfütterung oder Reduktion des Wildbestandes ermöglichen. Bereits seit 2009 existiert im Bundesland Vorarlberg ein landesweites Rotwild-TBC-Monitoring und seit 2013 wurde zusätzlich im Bezirk Bludenz ein Bekämpfungsgebiet eingerichtet. Auch im Bundesland Tirol wurde im Jahr 2011 zum ersten Mal ein Seuchengebiet (Bekämpfungszone von 5.000 ha; Überwachungszone von 30.000 ha) definiert und ausgewiesen (Bezirk Reutte). Seit dem Jahr 2012 führt Tirol auch ein Rotwild-Screening neben dem Seuchengebiet Lechtal in den „Hotspot“-Bezirken („Tirol-Karwendel-Screening“ mit Revieren im Karwendel, in den Bezirken Innsbruck-Land, Schwaz, Landeck und Kufstein) durch (KVG, 2016). In Tabelle 7 sind die durch das Rotwild-TBC-Monitoring in Tirol und Vorarlberg detektierten *M.-caprae*-Infektionen beim Rotwild in den Jahren 2009 bis 2015 zusammengefasst.



**Tabelle 7: *M.-caprae*-positive Hirsche des landesweiten Rotwild–Tuberkulose–Monitorings in Tirol und Vorarlberg in den Jagdjahren 2009 bis 2015**

Jahr	Tirol Seuchengebiet	Tirol Karwendel-Screening	Vorarlberg
	Anzahl an <i>M.-caprae</i> - positiven Rotwild	Anzahl an <i>M.-caprae</i> - positiven Rotwild	Anzahl an <i>M.-caprae</i> - positiven Rotwild
2009	keine Untersuchungsaktion	keine Untersuchungsaktion	7
2010	keine Untersuchungsaktion	keine Untersuchungsaktion	4
2011	82	keine Untersuchungsaktion	8
2012	51	0	7
2013	12	2	24
2014	15	5	72
2015	27	2	43

Datenquelle: VerbraucherInnen-Gesundheit des Bundesministeriums für Gesundheit (KVG, 2016). Im Bundesland Vorarlberg besteht seit 2014 im Bezirk Bludenz ein Rotwild-TBC-Bekämpfungsgebiet und die *M.-caprae*-positiven Proben aus dem Jagdjahr 2014 und 2015 stammen fast gänzlich aus diesem Gebiet.

Die Untersuchung der *M.-caprae*-Genotypen aus dem österreichischen oberen Lechtal mittels MIRU-VNTR (MIRU = mycobacterial interspersed repetitive unit; VNTR = variable number of tandem repeats) und Spoligotyping ergab seit 1999 einen identischen Genotyp in der Rinder- und Rotwildpopulation (PRODINGER et al., 2002; SCHOEPP et al., 2012), und man sieht dieses Gebiet mit seinem Rotwildbestand daher als Erregerreservoir für die Tuberkulose bei Nutz- und Wildtieren an (SCHOEPP et al., 2010; 2012). Im MIRU-VNTR treten lediglich geringfügige Variationen in drei Loci von neun Isolaten auf (SCHOEPP et al., 2012; DOMOGALLA, 2014). In den Jahren 2010 bis 2015 wurden laut der Zoonoseberichte in Österreich einige kulturell bestätigte *M.-caprae*-Tuberkulosefälle beim Menschen gemeldet (Tabelle 7). Ein Zusammenhang der humanen *M.-caprae*-Infektionen mit dem derzeitigen Auftreten des Erregers im Tierbestand in Westösterreich wurde von 2010 bis 2014 durchwegs ausgeschlossen (AGES, 2014), jedoch stellte man im Jahr 2015 nach genauer Analyse zweier humaner Erkrankungsfälle (Geschwisterpaar aus Bezirk Bludenz) im Vorarlberg fest, dass es sich bei diesen *M.-caprae*-Fällen um denselben Erregertyp wie beim Rind und Rotwild handelt. Ein Zusammenhang zu aktuellen Infektionen beim Rind oder Rotwild konnte aber nicht nachgewiesen werden, so dass man bei beiden Fällen eine alte, Jahre zurückliegende Infektion annimmt (Landessanitätsdirektion Vorarlberg 2016; AGES, 2016).

**Tabelle 8: In Österreich durch *M. bovis* und *M. caprae* verursachte humane Tuberkulosefälle von 2010 bis 2015**

Jahr	Tuberkulosefälle des Menschen	
	<i>M.-bovis</i> - kulturell bestätigt	<i>M.-caprae</i> - kulturell bestätigt
2010	4	3
2011	0	2
2012	1	1
2013	1	2
2014	1	1
2015	0	2

Datenquelle: Zoonose-Jahresberichte (AGES, 2016)

#### 4.5 Die Rindertuberkulose weltweit

Rindertuberkulose ist weltweit bekannt mit Ausnahme der Antarktis (MARTIN-HERNANDO et al., 2010). Generell kann gesagt werden, wo es Rinder gibt, existiert die Rindertuberkulose. In Australien, manchen karibischen Inseln und Teilen Südamerikas wurde die Ausrottung erreicht, und in Ländern wie USA, Kanada, Europa – außer den britischen Inseln - und Südafrika wurde die Rindertuberkulose auf ein vernachlässigbares Niveau reduziert.

**Frankreich** gilt seit 2000 offiziell frei von Rindertuberkulose. Jedoch sind seither erneute Tuberkulosefälle (*M. bovis*) gemeldet worden, und eine Zunahme bei Rot- und Schwarzwild (PAYNE et al., 2015), sowie bei Haustieren in der Normandie konnte ebenfalls festgestellt werden (ZANELLA et al., 2008). Die Infektionsfälle konzentrieren sich seit 2000 vor allem auf zwei Regionen, Côte d'Or (Mittlerer Osten) und Dordogne (Süd-West) mit fast 40 % aller gemeldeten Fälle. Aber auch in den Regionen Camargue (Süd), Normandie (Mitte-Nord) und im Süd-Westen ist die Rindertuberkulose in Vieh- und Wildtierbeständen endemisch (CHE et al., 2006; HAUER et al., 2015; BARBIER et al., 2016).

In **Italien** sind nicht alle Regionen von der Europäischen Union als amtlich tuberkulosefrei anerkannt. Die bovine Tuberkulose ist für die Viehhaltung vor allem im Süden von Italien (Sizilien, Kalabrien, Kampanien, Apulien) von großer Bedeutung (BONIOTTI et al., 2009; MAMMINA et al., 2014). Italien startete in den 1960er mit Programmen zur Tilgung der Rindertuberkulose, und 1977 wurde das verpflichtende „test and slaughter“ Programm

eingeführt (DONDO et al., 2008). Einen potentiellen Anteil am Fortbestehen der bovinen Tuberkulose in Italien haben die *M.-bovis*-infizierten Wildtierpopulationen, die am häufigsten die Wildwiederkäuer betreffen (PESCIAROLI et al., 2014; AMATO et al., 2016). Aber auch von *M.-caprae*-infiziertem Rotwild wurde berichtet (CHIARI et al., 2014).

Die **Schweiz** ist laut der Definition der OIE bereits seit 1960 tuberkulosefrei und wurde 1999 als offiziell tuberkulosefrei anerkannt (OTF). Wie in anderen Ländern ohne Wildtierreservoirs hatten sich die Test- und Tötungsstrategien zur Rindertuberkulose-Bekämpfung auch in der Schweiz bewährt. Dennoch sieht man als großen Risikofaktor der Rindertuberkulose in der Schweiz den zunehmenden Viehhandel und den direkten Kontakt von Schweizer Rindern mit eventuell bTB-infizierten Rindern oder Wildtieren, beispielsweise während der Sömmerung auf der Alpe und befürwortet ein „pre-movement testing“ (SCHILLER et al., 2011).

Die Tuberkulosereservoirs in der Wildtierpopulation sind in vielen Ländern für das Fortbestehen oder die Zunahme der Inzidenz der Rindertuberkulose verantwortlich, vor allem Irland und das Vereinigte Königreich (UK) haben derzeit die höchsten bTB-Prävalenzen in Europa, und diese stehen in starkem Zusammenhang mit der Wildtierpopulation (TORGERSON & TORGERSON, 2010).

In **Irland** wurde erstmals 1974 von Tuberkulose in Dachsen berichtet. Inzwischen sind die eurasischen Dachse (Eurasian badgers, *Meles meles*) in Nordirland als Wildreservoir für bTB beschrieben (DENNY & WILESMITH, 1999; ABERNETHY et al., 2006; MURPHY et al., 2010; 2011). Um der hohen Inzidenz an bTB-infizierten Dachsen entgegenzuwirken und das Risiko einer Übertragung auf Rinder zu reduzieren (OLEA-POPELKA et al., 2009), wurden seit 2003 lokal bis flächendeckende Keulungsprogramme entwickelt und die Dachspopulation stark dezimiert (GRIFFIN et al., 2005; SHERIDAN 2011; 2014; THOEN et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass das proaktive Keulen zu einer langfristigen Abnahme der Prävalenz von Tuberkulose in der wieder zunehmenden Dachspopulation führte (MAIRTIN et al., 1998; LA CORNER et al., 2008). Ferner arbeitet man derzeit an der Etablierung einer erfolgreichen Wildtier-Impfstrategie gegen Tuberkulose. Um der hohen bTB-Prävalenz in Rinderbeständen entgegenzuwirken, werden alle Rinder im Alter von sechs Wochen jährlich mittels Intrakutan-Test getestet und EDV-Tracing-Programme zur Ermittlung eventueller Kontaktbestände und –rinder verwendet. Ferner dürfen Kontaktbestände keine Tiere aus ihrem Bestand bewegen, ohne mehrere Tests im 42 bis 60-Tage Intervall durchgeführt zu haben (ABERNETHY et al., 2006; O'HAGAN et al., 2015).

Ähnlich wie in Irland, gestaltet sich auch in **England** die endgültige Ausrottung der Rindertuberkulose schwierig, da der Dachs (*Meles meles*) auch in England endemisch mit boviner Tuberkulose infiziert ist. Die Tuberkulose gilt im Vereinigten Königreich trotz fortlaufender Bekämpfung der Krankheit, als die größte Gefahr für die Rinderbestände (WILSON et al., 2011; GOODCHILD et al., 2015). Seit Mitte der 1970er Jahre wurden Dachse in das nationale Tilgungsprogramm als mögliche Infektionsquelle für Rinder miteinbezogen. Auch in England gilt die BCG-Impfung gegen bTB sowohl bei Dachsen, als auch bei Rindern als attraktive Kontrollmöglichkeit für die kurz- bis mittelfristige Anwendung (LESELLIER et al., 2006; 2009; WILSON et al., 2011; WATERS et al., 2012; CHAMBERS et al., 2014). Bei Dachsen wurde die Verabreichung von Impfstoffen in oralen Ködern im Feld als die beste langfristige Perspektive genannt (DELAHAY et al., 2003; ROBERTSON et al., 2016).

**Neuseeland** und **Australien** starteten 1940 mit dem Pflichtbekämpfungsprogramm, um die Tuberkulose bei Rindern und Hirschen zu tilgen (TWEDDLE & LIVINGSTONE, 1994). In Australien reduzierten sich die Fälle stark und bereits Anfang der 90iger Jahre war die Rindertuberkulose getilgt. In Neuseeland hingegen behinderte das *M.-bovis*-infizierte Wildtierreservoir die Rindertuberkulose-Tilgung stark und führte zu einer Wiedereinschleppung der Tuberkulose in den Rinderbestand durch tuberkulosekranke Fuchskusus (brush-tail possum, *Trichosurus vulpecula*) und teilweise auch durch infiziertes Farmwild (TWEDDLE & LIVINGSTONE, 1994; RYAN et al., 2006). Auch in Neuseeland arbeitet man in gegenwärtigen Forschungsprojekten an der oralen Verabreichung von Impfstoffen gegen bTB, sowie an geeigneten Köderformulierungen für den wildlebenden Fuchskusus (TOMPKINS et al., 2009).

In den **Vereinigten Staaten von Amerika** begann die Tuberkulosebekämpfung bereits Anfang des 19. Jahrhunderts (ESSEY & KOLLER, 1994). Nach erfolgreicher Abnahme der Tuberkuloseprävalenz in Rinderherden wurde 1960 der routinemäßige Intrakutan-Test ausgesetzt, und der Schwerpunkt auf die post-mortem-Schlachtüberwachung in Kombination mit Rückverfolgungsuntersuchungen gesetzt (ESSEY & KOLLER, 1994; FRYE, 1995; GILSDORF et al., 2008; HUMPHREY et al., 2014). Der legale und illegale Import von Rindern in die USA stellte jedoch ein großes Risiko für die amerikanische Fleisch- und Milchindustrie dar (USDA, 2011). Obwohl etwa doppelt so viele Rinder aus Kanada importiert wurden, galten besonders die jungen Mastrinder aus Mexiko als hohes Risiko für eine TB-Einschleppung in die USA. Ebenfalls eine bedeutende Infektionsquelle für die

Rinderherden stellen freilebende und auf Farmen gehaltene Hirschartige dar (ESSEY & KOLLER, 1994). Speziell in Michigan ist die Hirsch-Population (speziell der Weißwedelhirsch, *Odocoileus virginianus*) eine bedeutende Infektionsquelle für bTB (PAYEUR et al., 2002; SCHMITT et al., 2002; MILIAN-SUAZO et al., 2008; BERENTSEN et al., 2011; O'BRIEN et al., 2011; BROOK et al., 2013; RAMSEY et al., 2016; MURRAY et al., 2016; KANEENE et al., 2017).

In **Kanada** ist die TB-Prävalenz hingegen sehr niedrig (ESSEY & KOLLER, 1994; USDA, 2011). Hier konnte bTB im Bison (*Bison bison athabasca*) nachgewiesen werden (NISHI et al., 2006).

#### **4.6 Manifestation der Rindertuberkulose beim Rind**

Die klinischen Symptome der Rindertuberkulose beim erwachsenen Rind sind teils unspezifisch und unterscheiden sich je nach Lokalisation der Infektion (RADOSTITS et al., 2006). Häufige Symptome sind Leistungsabfall, Abmagerung, Fieberschübe und Husten (SMITH et al., 2006). Die Infektion des Rinds mit *M. bovis* verläuft in zwei Stufen. Die erste Phase beinhaltet die Granulom-Bildung an der Infektionsstelle und an den lokalen Lymphknoten. Diese Phase ist in der Regel asymptomatisch, und das weitere Fortschreiten der Erkrankung hinsichtlich des zeitlichen und örtlichen Verlaufs ist sehr unterschiedlich (RADOSTITS et al., 2006). Die pathologischen Veränderungen beim Rind sind hauptsächlich im Respirations- oder Gastrointestinaltrakt, sowie in den regionalen Lymphknoten lokalisiert (GORMLEY et al., 2006; CORNER et al., 1990). Aufgrund der chronischen Eigenschaft der Krankheit und der variablen Lokalisation der Infektion ist die Tuberkulose oft nur im fortgeschrittenen Krankheitsstadium im Rahmen der Schlachttier- und Fleischuntersuchung zu diagnostizieren (WHIPPLE et al., 1996; RADOSTITS et al., 2006). Jedoch kann eine frühe Phase der Infektion vorliegen, in der die Läsionen zu klein sind, um sie visuell erkennen zu können (non visible lesions, NVL) (LA CORNER, 1994; GAVIER-WIDEN et al., 2009), und makroskopische Läsionen (Granulombildung) bilden sich ferner nicht immer an Stellen, die routinemäßig durch amtliche Fleischkontrollen am Schlachthof untersucht werden können (WHIPPLE et al., 1996). Die Entwicklung von sichtbaren Läsionen ist eine Folge der Immunantwort auf die Gewebeinvasion der Erreger (GORMLEY et al., 2006).

## 5 Diagnostik von Tuberkulose und Tuberkuloseerregern

Für die Diagnostik der Tuberkulose sind beim Menschen Befunde im Röntgen-Thorax wegweisend, aber auch laborimmunologische Verfahren wie beispielsweise der  $\gamma$ -Interferon-Test und/oder der Tuberkulin-Hauttest sind bei Mensch und Tier übliche, indirekte Erregerkontaktnachweise. Zur Bestätigung einer Diagnose wird ein direkter Erreger(genom)-nachweis in der Mikroskopie, Kultur und/oder PCR vorgenommen. Da Mykobakterien nur langsam wachsen, in Makrophagen (Granulomen) persistieren und ihre Zellwand von Medikamenten kaum penetriert werden kann, ist eine Tuberkulosetherapie beim Menschen langwierig und kompliziert (HEROLD, 2012). Eine Tuberkuloseerkrankung des Menschen durch *M. bovis* zeigt dasselbe Krankheitsbild wie eine Erkrankung nach *M. tuberculosis*-Infektion, und eine Unterscheidung ist letztlich nur durch eine Speziesdifferenzierung möglich. Da für eine suffiziente Therapie nicht nur die Unterscheidung zwischen NTM und MTC, sondern auch eine Differenzierung auf Subspeziesebene erforderlich ist, haben sich verschiedene molekulare Differenzierungsmethoden entwickelt. Als molekulare Zielsequenzen für den Nachweis des MTC eignet sich das Gen der 16S rRNA (SREEVATSAN et al., 1997; KELLER et al., 2010; ROTH et al., 1998; WOO et al., 2008), entweder in der Probe (REISNER et al., 1994), oder zur Sequenzierung (KIRSCHNER et al., 1993; HALL et al., 2003). Eine Differenzierung kann auch durch die Analyse der Genabschnitte des *gyrB*-Gens (KASAI et al., 2000), des 32-kDa Protein-Gens (SOINI et al., 1994), des Insertionselements-IS1081 (TAYLOR et al., 2007 b), des 65-kDa-Hitzeschockproteins (RINGUET et al., 1999), der Hypothetischen Helicase (RODRIGUEZ et al., 1995), sowie die 16S-23S ITS-Region (ITS = internal transcribed spacer) erfolgen (ROTH et al., 1998; WILLIAMS et al., 2007). Eine Unterscheidung der MTC-Mitglieder auf Subspeziesebene ist hiermit jedoch nicht möglich. Hierfür haben sich Differenzierungsmethoden wie Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken, Spoligotyping, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus, MIRU-VNTR-Typisierung, Large Sequence Polymorphisms (LSPs), Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) oder Whole Genome Sequencing (WGS) bewährt.

## 5.1 Indirekter Erregernachweis

### 5.1.1 Intrakutane Tuberkulin-Untersuchung nach Mendel-Mantoux beim Rind

Der intrakutane Tuberkulin-Hauttest beim Rind erfolgt ähnlich wie beim Mensch, ebenfalls nach Mendel-Mantoux. Der Intrakutan-Test, auch SICCT (single intradermal comparative cervical tuberculin test) genannt, kann auf unterschiedliche Weisen angewendet werden (SCHILLER et al., 2010), jedoch ist in Deutschland die Durchführung und Auswertung des Tuberkulin-Hauttests genau vorgeschrieben und im Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG in der aktuell gültigen Fassung nachzulesen. Dabei werden Rinder in regelmäßigem Rhythmus durch strikt intrakutane Tuberkulinapplikation zweier hochgereinigter Proteinderivate (PPD= purified protein derivative) getestet (Simultantest). Das „Rindertuberkulin-PPD für Tiere“ besteht aus einem bovinen PPD aus den Überständen von *M.-bovis*-Kulturen, und zusätzlich wird aviäres PPD aus *M.-avium*-Kulturen als „Geflügel-PPD für Tiere“ als vergleichende Tuberkulinprobe zur Abklärung möglicher Kreuzreaktionen mit NTM-Erregern verwendet. Bei dem sogenannten Intrakutan-Monotest wird allein bovines PPD verabreicht. Vor und 72 Stunden nach Injektion am Hals (Monotest zwischen dem ersten und dem mittleren Nackendrittel in craniocaudaler Richtung, bzw. beim Simultantest soll das aviäre Tuberkulin ca. 10 cm unter der Kammlinie des Halses liegen in dorsoventraler Richtung und das bovine Tuberkulin mindestens 12,5 cm tiefer parallel zur Vorderkante des Schulterblattes) wird die Hautdickenzunahme ermittelt. Auf eine unspezifische Entzündungsreaktion erfolgt im positiven Fall eine Ansammlung von spezifischen, aus Hautgefäßen ausgetretenen CD4+ T-Zellen (TH1) in das Gewebe an der Injektionsstelle und vermitteln eine von den T-Zellen abhängige lokale Überempfindlichkeitsreaktion (DTH). Diese TH1-Zellen erkennen Mykobakterienprotein-spezifische Peptide, die durch einen möglichen Kontakt mit dem Antigen zuvor generiert und als MHC-II Komplexe präsentiert wurden. Infolge der Aktivierung der TH1-Zellen werden inflammatorische Zytokine, wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\beta$ , freigesetzt (ANDERSEN & SMEDEGAARD, 2000; ANCELET, 2013; SAKAI et al., 2014). Die korrekte intradermale Injektion der vorgeschriebenen Dosis beträgt 0,1 ml je Injektion und, um Applikationsfehler zu vermeiden, sollte die Hautdicke vor und 72 Stunden nach Injektion von der gleichen Person gemessen werden (OIE, 2009). Als negatives Testergebnis ist der bovine Intrakutan-Hauttest zu bewerten, wenn die Hautdickenzunahme unter 2 mm liegt und keine klinischen Veränderungen, wie beispielsweise das Auftreten von Ödemen, Schorf oder Schmerzempfinden an der Injektionsstelle zu beobachten sind. Wenn die Hautdickenzunahme zwischen 2 – 4 mm liegt und keine klinischen Veränderungen vorliegen,

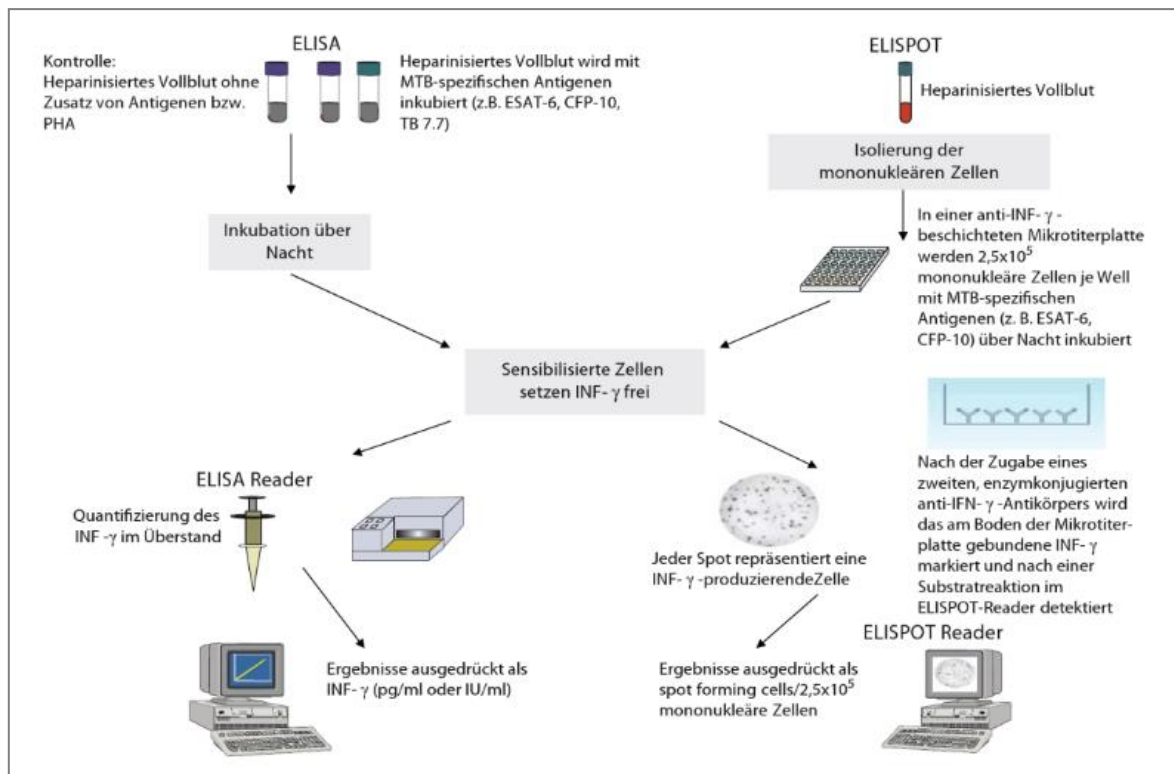
spricht man von einem zweifelhaften Ergebnis. Eine Rindertuberkulose wird festgestellt beim Auftreten von klinischen Veränderungen oder einer Dickenzunahme der Haut über 4 mm Differenz gegenüber der Reaktion auf *M.-avium*-Injektion (RICHTLINIE 64/432/EWG). Ein mögliches Problem des Simultantests ist die parallele Infektion mit NTM- und MTC-Erregern, welche einen erschwerten und maskierten Nachweis von Rindertuberkulose zur Folge haben kann. Auch sind, wie beim Menschen, Kreuzreaktionen nach einer BCG-Impfung mit falsch-positivem Tuberkulin-Hauttestergebnis möglich (THOM et al., 2008), jedoch ist in Deutschland die BCG-Impfung beim Rind mit Ausnahmen zur Durchführung wissenschaftlicher Versuche (VORDERMEIER et al., 2002; AMENI et al., 2010) verboten (MOSEER et al., 2014). Zarden et al. konnten ferner zeigen, dass Milchkühe aus einem Tuberkulose-befallenen Bestand trotz eines negativen SICCT Ergebnisses *M. bovis* Erreger in ihrer Milch ausscheiden (ZARDEN et al., 2013). Daher ist neben dem Intrakutan-Test, der IFN- $\gamma$ -Bluttest ein wesentlicher Bestandteil in der Diagnostik der Rindertuberkulose geworden (COAD et al., 2008). Zudem wird vermutet, dass es genetische Variationen in einer Resistenzentwicklung gegen bTB-Infektionen bei Rindern gibt (BERMINGHAM et al., 2009; BROTHERSTONE et al., 2010). Dennoch ist der SICCT mit einer Sensitivität von > 99% und einer Spezifität von 55 - 91% ein robuster Test zum Zwecke der bTB-Kontrolle bei allen Rinderrassen (LA RUA-DOMENECH et al., 2006; CLEGG et al., 2011; TSAIRIDOU et al., 2016).

### 5.1.2 Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ )-Bluttest (Quantiferon-Test)

Der IFN- $\gamma$ -Bluttest ist ein immunologischer Test, der die Menge an Interferon- $\gamma$  misst, das durch sensibilisierte T-Lymphozyten bei einem vorausgehenden *M. tuberculosis*-Kontakt nach *in-vitro*-Restimulation ausgeschüttet wird. Diese T-Zellen werden *in-vitro* mit spezifischen, von der RD1-Region des Genoms codierten, immunogenen Peptiden von *M. tuberculosis* re-stimuliert (PAI et al., 2004). Diese Peptide fehlen bei *M. bovis* BCG und den meisten NTM, außer *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* (NIENHAUS 2009) und *M. riyadhense* (VAN INGEN et al., 2009). Dadurch wird eine hohe Spezifität bei einem geringeren Kreuzreaktionsrisiko aufgrund von BCG-Impfungen und nicht-tuberkulose-verursachenden Mykobakterien (NTM) erreicht (PAI et al., 2004). Dieser spezifische Test mit der quantifizierbaren IFN- $\gamma$ -Freisetzung von mononukleären Zellen aus dem Blut ist als „enzyme linked immunosorbent Assay“ (ELISA) (Quantiferon-TB-Gold-Test) und als „enzyme linked immunospot“ (ELISpot) (T-Spot-TB-Test) beim Menschen im Einsatz (OIE, 2009; COSTABEL & KROEGEL, 2013; ARLEHAMN et al., 2012). Zunächst werden die T-



Lymphozyten aus dem Blut des Patienten *in-vitro* mit den synthetischen *M.-tuberculosis*-spezifischen Peptiden, den sogenannten ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target), CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein) und TB-7.7 (Rv2654c, mögliches phiRv2 Phagen Protein) Antigenen über Nacht stimuliert (VAN PINXTEREN et al., 2000; BROSCHE et al., 2002; SIDDERSEN et al., 2008; NIENHAUS 2009; MILLINGTON et al., 2011; ARLEHAMN et al., 2012). Hat ein MTC-Kontakt stattgefunden oder ist eine TBC-Infektion vorhanden, setzen T-Zellen mit spezifischer Aktivität gegen diese Antigene nach Stimulation IFN- $\gamma$  frei, und eine Sekretion von IFN- $\gamma$  kann in einem anschließenden ELISA Reader im Überstand quantitativ nachgewiesen werden. Beim ELISpot-Test hingegen werden direkt sensibilisierte T-Zellen über ihre Cytokin-Freisetzung nachgewiesen. Hier werden, im Gegensatz zum Quantiferon-Test, periphere monozytäre Blutzellen (PBMC) aus dem Vollblut des Patienten isoliert und in Mikrotiterplatten mit TB-spezifischen Antigenen (ESAT-6 und CFP-10) inkubiert (VAN PINXTEREN et al., 2000; MATTHYS & SEEGER, 2009). Durch die Antigen-Stimulation kommt es zur Freisetzung von Cytokinen, die sich an spezifische Antikörper anlagern, und diese wiederum können in einer anschließenden Farbreaktion detektiert werden (MATTHYS & SEEGER, 2009). Beide Tests haben den Vorteil, dass sie unabhängig vom Impfstatus des Patienten sind (BROCK et al., 2001; PAI et al., 2004), ein Ergebnis binnen 24 Stunden zu erwarten ist und kein Booster-Effekt auftritt (beliebige Wiederholung möglich) (NIENHAUS, 2009). Jedoch kann im Falle eines positiven Testergebnisses nicht zwischen einer chronischen Infektion oder einer aktiven Erkrankung unterschieden werden und weiterführende Untersuchungen sind erforderlich. Die Abbildung 4 gibt einen Überblick über die beiden IFN- $\gamma$ -Testmethoden.



**Abbildung 4: Überblick über die IFN-γ-Nachweismöglichkeiten zur Tuberkulosedagnostik (MATTHYS & SEEGER, 2009)**

### 5.1.3 BOVIGAM-IFN-γ-Test für Rinder

Der BOVIGAM®-IFN-γ-Test der Firma Prionics (jetzt Thermo Fisher) ist ein kommerzieller *in-vitro*-Bluttest für Rinder und wird in vielen Ländern zur Rindertuberkulose-Diagnostik verwendet (SCHILLER et al., 2009; SCHILLER et al., 2011; BASS et al., 2013). Das Prinzip des Tests entspricht der Reaktion der T-Lymphozyten (CD4-T-Zellen) nach vorheriger Sensibilisierung durch Tuberkuloseerreger mit anschließender IFN-γ-Freisetzung, wie dies unter Abschnitt 5.1.2 beschrieben ist. Jedoch erfolgt im Bovigam-Test eine Stimulation der T-Lymphozyten direkt in einer Vollblutprobe des Rindes mit bovinem PPD und zusätzlich mit aviärem PPD, um Kreuzreaktionen zu überprüfen (ROTHER et al., 1990). Allerdings sind fragliche oder falsch positive Ergebnisse nach vorangegangenem Kontakt zu NTM möglich (BEZOS et al., 2010). Die Vollblutprobe muss für eine erfolgreiche Durchführung des Tests lebende und teilungsfähige T-Lymphozyten enthalten, jedoch ist zu bedenken, dass nicht zu jedem Zeitpunkt einer Blutentnahme gleich viele spezifische T-Lymphozyten im Blut vorhanden sind (WESTERMANN & PABST, 1992) und auch diverse prä- und postkollektive Parameter (Blutabnahme, Temperatur und Zeit der Blutlagerung, Kulturdauer und -bedingungen, Probenqualität und Temperatur, Antigene) eine *in-vitro*-IFN-γ-Produktion

beeinflussen können (WATERS et al., 2007; SCHILLER et al., 2009). Um die Diagnostik der Rindertuberkulose durch eine höher-spezifische Restimulation der Blutproben zu verbessern, werden gezielt spezifischere Antigene gesucht. Neuerdings kommen die in der Humanmedizin verwendeten synthetischen Antigene ESAT-6, CFP-10 und Rv3615c (SIDDERs et al., 2008; MILLINGTON et al., 2011) auch beim Rind zum Einsatz (VORDERMEIER et al., 2001; MUSTAFA et al., 2002). Diese Peptide, für die bei den meisten NTM die kodierenden Genombereiche fehlen und die auch im Genom von *M. bovis* BCG deletiert sind (MAHAIRAS et al., 1996; BEHR et al., 1999; GARNIER et al., 2003; VAN INGEN et al., 2009), können einzeln oder als „Antigencocktail“ verwendet werden und ermöglichen eine erheblich spezifischere Diagnostik (PAI et al., 2004; OIE, 2009; WHELAN et al., 2010; JONES et al., 2012).

Der BOVIGAM-Test bietet keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen einer chronisch persistenten und einer akuten Tuberkulose, und die zellvermittelte Immunantwort kann abhängig vom Alter der infizierten Rinder das Testergebnis beeinflussen (LIM et al., 2012). So reagiert die Immunabwehr bei Kälbern unter 6 Monaten (innate immunity) unspezifisch mit einer Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung, u.a. durch Natural Killerzellen (NK) und kann ein falsch-positives Ergebnis erzeugen (OLSEN et al., 2005; GORMLEY et al., 2013). Ferner sind falsch-negative Ergebnisse bei Tieren möglich, die sich in einem sehr frühen Stadium der Infektion befinden und noch keine ausreichende zellvermittelte Immunantwort besitzen (GORMLEY et al., 2006), oder auch bei Tieren, die sich in einem späteren Krankheitsstadium befinden und/oder aufgrund anderer Faktoren ein geschwächtes Immunsystem aufweisen (WOOD & JONES, 2001; LA RUA-DOMENECH et al., 2006; PALMER et al., 2006). Zur amtlichen Feststellung eines Rindertuberkuloseausbruchs in Deutschland erfolgt nach einem positiven oder zweifelhaften Tuberkulin-Test oder Bovigam-Test immer post-mortem ein Erregernachweis mittels PCR oder Kultur (LGL, 2011). Lahuerta-Marin et al. konnten die Wichtigkeit einer Eliminierung von infizierten Tieren aus einer Herde zeigen (LAHUERTA-MARIN et al., 2015), was letztlich auch für Tiere mit zweifelhaften Testergebnissen von Vorteil für die Rindertuberkulosebekämpfung ist.

## **5.2 Direkter Erregernachweis**

### **5.2.1 Mikroskopischer Nachweis**

Für den Bakteriennachweis kann Sputum, Bronchialsekret, Magensaft, Urin, Ejakulat, Pleuraflüssigkeit, Liquor oder ein Hautabstrich verwendet werden. Die Diagnostik erfolgt

mikroskopisch durch eine Spezialfärbung nach Ziehl-Neelsen (COOK, 1997) oder durch Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe einer Auramin-Färbung (NEUMEISTER et al., 2009), in der Mykobakterien dauerhaft angefärbt werden können. Eine Gramfärbung gelingt nur bedingt. Die Mikroskopie weist nur eine geringe Sensitivität und Spezifität auf. Rein mikroskopisch können zwar säurefeste Stäbchen identifiziert werden, es ist jedoch keine Differenzierung zwischen tuberkulösen (MTC)- und nichttuberkulösen Bakterien (NTM), sowie anderen stäbchenförmigen säurefesten Erregern möglich (NEUMEISTER et al., 2009). Es ist ein sehr schnelles Ergebnis zu erwarten, jedoch ist eine Bakterienzahl von mindestens  $10^4$  Keimen/ml (Colony Forming Units = CFU) notwendig (ALLEN & MITCHISON, 1992). Daher spricht ein negativer mikroskopischer Befund nicht zwingend gegen eine Tuberkuloseerkrankung (HEROLD, 2012).

### **5.2.2 Kulturoisolierung**

Der Goldstandard in der Tuberkulose-Diagnostik ist der kulturelle Nachweis (NEUMEISTER et al., 2009; SCHILLER et al., 2011) nach einer Dekontamination des Untersuchungsmaterials durch N-Acetyl-L-Cystein-NaOH zur Beseitigung von Begleitbakterien und einer anschließenden Kombination von Flüssig- und Festnährmedium-Beimpfung (NEUMEISTER et al., 2009). Dabei werden die Tuberkuloseerreger je nach Spezies auf Spezialnährböden (z.B. lipidhaltiger Löwenstein-Jensen-Agar) unter aeroben Bedingungen bei 24 bis 37 °C bis zu sechs Wochen (evtl. bis zu zwölf Wochen) kultiviert (HEROLD, 2012). Aufgrund der langen Teilungszeiten der langsam wachsenden Mykobakterien von 16-20 Stunden pro Teilungszyklus dauert die Anzucht der Mykobakterien auf Festnährböden etwa 30 Tage, auf Flüssignährböden (z.B. BACTEC-Verfahren) nur 10-14 Tage bis zur Diagnosestellung (SMITH, 2003). Das nationale veterinärmedizinische Referenzlabor für Tuberkulose, das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), empfiehlt in seiner veröffentlichten amtlichen Methodensammlung die Festnährböden Löwenstein-Jensen und Stonebrink und die Flüssigmedien Middlebrook und Kirchner zur Kultivierung von Mykobakterien. Die Mykobakterien-Kultur (Abbildung 5) zeichnet sich auf Festnährboden durch ihre raue Form und ihre hell-weiß bis gelblichen, oft konfluierenden Kolonien aus. Nach einem erfolgreichen kulturellen Mykobakterien-Nachweis ist eine Testung auf Medikamentenresistenzen möglich (HAUER et al., 2011).



**Abbildung 5: *M.-caprae*-Kultur auf einem Festnährboden (Foto Dr. S. Hörmansdorfer, LGL, 2011)**

### **5.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) hat sich als Standardverfahren in der modernen Diagnostik etabliert und basiert auf der *in-vitro*-Vervielfältigung der Erbsubstanz (DNA). Sie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus und verkürzt die Zeit der Tuberkulosediagnostik auf wenige Stunden. Auch bei niedrigen Bakterienzahlen und kleinem Probevolumen ist ein Nachweis trotzdem möglich. Der Erfolg der PCR ist unabhängig von der Lebensfähigkeit und der Physiologie der Mykobakterien. Die PCR weist lediglich eine DNA-Sequenz nach, eine Unterscheidung zwischen lebensfähigen und abgetöteten Infektionserregern (z.B. nekrotisches Gewebe) ist demnach nicht möglich. Obwohl die PCR teurer ist und ein höheres Maß an labortechnischer Ausstattung als andere Methoden erfordert, ist sie mittlerweile in der TBC-Diagnostik ein Standardverfahren geworden.

### **5.2.4 PCR als Molekularbiologischer Nachweis der Rindertuberkulose**

Die Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (real time PCR) dient zum schnellen Nachweis von mykobakterieller DNA direkt aus dem Untersuchungsmaterial in Blut- oder Gewebeproben bei Rindern. Die in Deutschland in der amtlichen Methodensammlung beschriebene Methode zum Nachweis von MTC-DNA ist eine duplex real-time PCR und wird vom Nationalen Referenzlabor (NRL) des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) vorgeschrieben. Zwei Genorte werden als Zielsequenz für diese PCR genutzt, zum einen die hypothetische Helicase (HELI) (RODRIGUEZ et al., 1995), zum anderen das Insertionselement (IS) *IS1081*, das als repetitives Element im Genom von Mykobakterien vorkommt (TAYLOR et al., 2007 b). Für die Amplifizierung der Zielnukleotidsequenzen aus beiden Genorten werden entsprechend spezifische Primer und eine zusätzliche Sonde verwendet. Die vorgeschriebene

PCR amplifiziert ein 91-bp-Fragment aus dem Heli-Gen und 85 bp des *IS1081*-Gens. Als interne Kontrolle ist beta-Aktin ( $\beta$ -Aktin) integriert und muss zusätzlich zu beiden MTC-Fragmenten aus dem Gewebematerial amplifiziert werden.  $\beta$ -Aktin ist ein Multicopygen, welches mehrfach verteilt im Genom vorkommt und als Nachweis von Säugetier-DNA für eine erfolgreiche DNA-Extraktion erforderlich ist (LI et al., 2010). Ein positives PCR-Ergebnis liegt vor, wenn beide Zielsequenzen aus beiden Genorten nachgewiesen werden können. Ist nur eine Zielfrequenz nachweisbar, ist das Ergebnis als zweifelhaft zu werten. Für die Handhabung der PCR ist zu beachten, dass die vorangegangene DNA-Extraktionsmethode aus Gewebeproben einen entscheidenden Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Mykobakterien hat (FELL et al., 2016). PCR-Ergebnisse zum Nachweis von MTC-Nukleinsäuren direkt aus Gewebeproben (vor allem aus Gewebeproben ohne charakteristische Läsionen) zeigen oft nur eine Sensitivität von bis zu 75 % im Vergleich zu mykobakterieller DNA aus Kulturoisolen (LIÉBANA et al., 1995; TAYLOR et al., 2001; 2007 b; THACKER et al., 2011; COSTA et al., 2014). Das ist vor allem auf die Heterogenität der Mykobakterien-Verteilung im Gewebe und die Komplexität der mykobakteriellen Zellwand und daraus resultierenden schlechten Lysis-Eigenschaft zurückzuführen (COSTA et al., 2013; RADOMSKI et al., 2013). Eine DNA-Gewinnung aus größeren Gewebemengen ist auf jeden Fall ein großer Vorteil für die Erhöhung der Trefferwahrscheinlichkeit in der PCR (FELL et al., 2016). Auch Amplifikations-Inhibitoren in Gewebeproben zusammen mit großen Mengen an Co-extrahierter eukaryotischer Wirts-DNA stellen oft ein zusätzliches Problem dar (RADOMSKI et al., 2013; COSTA et al., 2014).

## **5.3 Differenzierung von MTC-Mitgliedern**

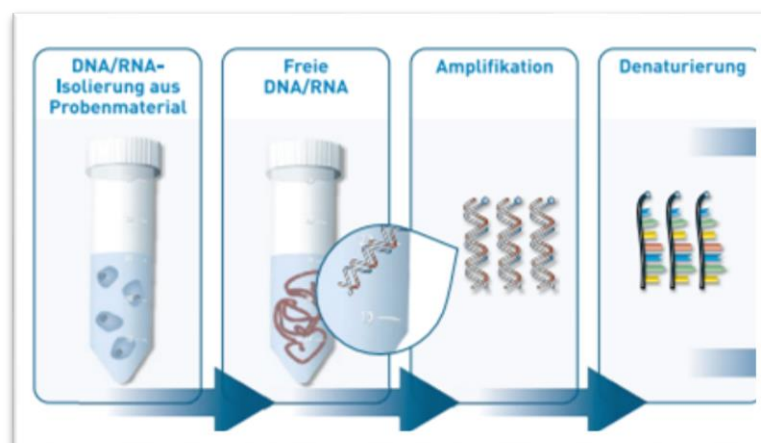
### **5.3.1 Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT)**

Die Nukleinsäure-Amplifikations-Technik (NAT) ermöglicht eine Schnelldiagnostik z.B. mittels PCR in 2-3 Tagen mit genauer Klassifizierung des Erregers in der Human- und Tiermedizin (COSTA et al., 2014). Jedoch ist bei einer zurückliegenden, ausgeheilten Tuberkuloseerkrankung mit einem positiven Testergebnis bis zu einem Jahr noch zu rechnen (HEROLD, 2012). Nachdem im Vergleich zur kulturellen Erregerisolierung, bei der Nukleinsäure-Amplifikations-Technik die Sensitivität von mikroskopisch-negativen Proben nur bei 80-90 % mit einer Spezifität von 95-99 % liegt, schließt ein negatives Ergebnis eine Tuberkuloseerkrankung nicht sicher aus (DARAI et al., 2012).

### 5.3.2 „DNA-STRIP-Technologie“

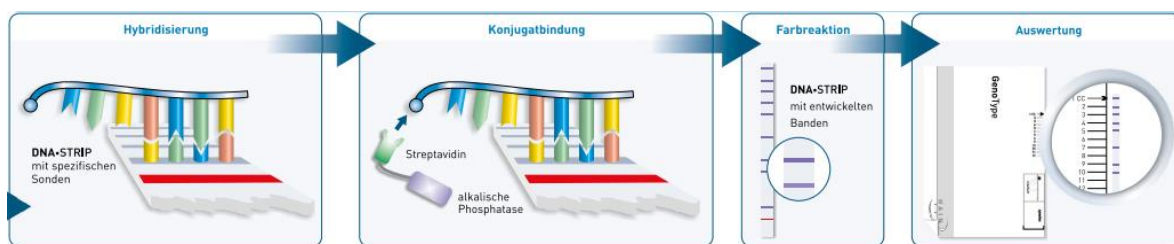
Das Prinzip der sogenannten „DNA-STRIP-Technologie“, wie sie von der Firma Hain Lifescience GmbH mit dem Geno-Type-MTBC-Test angeboten wird, besitzt eine hohe Sensitivität und eine maximale Spezifität. Es beruht auf der Amplifizierung, Hybridisierung und einer alkalischen Phosphatase-Reaktion mit DNA-Proben und dem Nachweis auf speziellen Membran-Streifen. Es ermöglicht die Differenzierung von *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* und *M. bovis* BCG (RICHTER et al., 2003; NEONAKIS et al., 2007).

Im ersten Schritt wird aus dem Ausgangsmaterial (Fest- oder Flüssigkultur) Nukleinsäure in Form von DNA oder RNA gewonnen (Abbildung 6). Im Anschluss an die DNA-Isolierung wird die Nukleinsäure in einer Amplifikationsreaktion selektiv vermehrt, indem die Sequenzen des 23S-rRNA-Gens, des *gyrB*-Gens und der RD1-Region gleichzeitig in einer Multiplex-PCR mit biotinylierten Primern amplifiziert werden. Das Amplifikat des 23S-rRNA-Gens dient zum einen als Amplifikationskontrolle für G/C-reiche, Gram-positive Bakterien, zum anderen als spezifische Sonde für MTC-Mitglieder. Hingegen umfassen die Fragmente des *gyrB*-Gens und der RD1-Region die speziesspezifischen Sequenzen (RICHTER et al., 2003). Im nächsten Schritt werden die Amplifikate chemisch denaturiert, da die Detektion auf dem DNA-STRIP anhand einzelsträngiger-DNA erfolgt (Hain Lifescience, 2015).



**Abbildung 6:** Prinzip der Probenaufbereitung für die „DNA-Strip-Technologie“. Ausgangspunkt ist Probenmaterial, aus dem Nukleinsäure gewonnen wird. Im nächsten Schritt folgt eine Amplifikationsreaktion mit anschließender Denaturierung (nach Hain Lifescience, 2015)

Der DNA-STRIP ist mit hochspezifischen Sonden (13 Oligonukleotide) beschichtet, die komplementär zu den selektierten Amplifikaten sind. Um die MTC-Spezies zu differenzieren, werden SNPs im *gyrB*-Gen und die Deletion in der RD1-Region verwendet (RICHTER et al., 2003). Nach der Denaturierung bindet das einzelsträngige Amplifikat im Verlauf der Hybridisierung (Abbildung 7) spezifisch an die Oligonukleotidsonden, welche die charakteristischen SNPs und Sequenzen aufweisen, während unspezifisch-gebundene Amplifikate in einem anschließenden Waschschriff entfernt werden. Das spezifisch gebundene Amplifikat wird während der Hybridisierungs-Reaktion mit dem Enzym alkalische Phosphatase markiert und anschließend in einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht. Auf dem DNA-STRIP entsteht ein spezifisches Bandenmuster, das sich durch Anlegen einer testspezifischen Auswertungsschablone schnell und eindeutig ablesen lässt. So ermöglicht der Geno-Type-MTBC-Test eine genaue Genotyp-Differenzierung zwischen den Vertretern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes und gewährleistet ein sicheres Abgrenzen des BCG-Impfstammes (Hain Lifescience, 2015).



**Abbildung 7: Prinzip der „DNA-Strip-Technologie“. Nach Denaturierung bindet das einzelsträngige Amplifikat spezifisch an die Sonden (Hybridisierung) und wird in einer anschließenden Farbreaktion sichtbar gemacht. Das entstandene Bandenmuster kann abgelesen und ausgewertet werden (Hain Lifescience, 2015)**

### 5.3.3 Restriktions-Fragment-Polymorphismus (RFLP)

Die erste Genotyping-Methode beruht auf der Analyse der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP, restriction fragment length polymorphism), in der repetitive DNA-Sequenzen als Sonden für DNA-Fingerprintings verwendet werden (EISENACH et al., 1988). RFLP wird in molekularen Studien zur Identifizierung von Ausbrüchen und Ansteckungswegen in der Tuberkulose-Epidemiologie genutzt (SMALL et al., 1994; MURRAY & NARDELL, 2002), sowie auch zur Identifizierung von Kontaminationen oder Bestätigung von Re-Infektionen (GENEWEIN et al., 1993; BARNES & CAVE, 2003). Durch Mutationen kann es zur Insertion, Deletion oder Duplikation einer Restriktionsschnittstelle



kommen, wodurch sich nach einem Restriktionsenzymverdau die Länge des resultierenden DNA-Fragmentes vom Wildtyp unterscheidet. Die gesuchten Fragmente lassen sich nach Größenauftrennung mittels Elektrophorese und Hybridisierung z.B. durch Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff darstellen (GRESSNER & ARNDT, 2013; RAMOS et al., 2014). Der Durchbruch der molekularbiologischen Methode *IS6110* RFLP (VAN EMBDEN et al., 1993) gelang kurz nach der Charakterisierung der *IS6110*-Insertionssequenz als Zielsequenz innerhalb des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (THIERRY et al., 1990). Diese Insertionssequenz ist im *M.-tuberculosis*-Genom in bis zu 20-facher Kopie vorhanden, jedoch sind in *M. bovis* nur 1–5 Kopien von *IS6110* gefunden worden, was zu einer Limitierung in der Unterscheidung auf Subspeziesebene führt (ARANAZ et al., 1999; VAN SOOLINGEN et al., 1993; 1994; 2001). Die Differenzierungsmethode *IS6110* RFLP ermöglicht eine Unterscheidung der MTC-Spezies (DURR et al., 2000; O'BRIEN et al., 2000) ist jedoch arbeitsintensiv, zeitraubend und benötigt viel qualitativ hochwertige DNA (VAN EMBDEN et al., 1993; KREMER et al., 1999; NEUMEISTER et al., 2009). Außerdem ist ein Ergebnisvergleich zwischen den Laboratorien schwer umsetzbar und wurde daher von neuen PCR-basierenden Methoden ersetzt (PRODINGER et al., 2005; COMAS et al., 2009; RAMOS et al., 2014).

#### 5.3.4 Differenzierung durch Spoligotyping

Spoligotyping (Spacer-Oligonucleotide-Typing) ist eine weitere Methode zur Speziesdifferenzierung im *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex und beruht auf der Verwendung eines Polymorphismus in der chromosomalen DR-Region (HERMANS et al., 1991; KAMERBEEK et al., 1997). Spoligotyping wird weniger in der Diagnostik als in epidemiologischen Studien eingesetzt (KAMERBEEK et al., 1997). Die regelmäßigen kurzen Palindrom-Wiederholungen (CRISPR), die auch als direkte Wiederholung (direct repeats, DRs) im Mykobakterien-Genom bekannt sind, bestehen aus vielen konservierten 36-bp umfassenden aufeinanderfolgenden Wiederholungen (VAN DER ZANDEN et al., 1998). Zwischen diesen DRs liegen 34 bp bis 41 bp sich nicht-wiederholende (non repetitive) Spacer-Regionen (HERMANS et al., 1991; XIA et al., 2016). Die DR-basierten PCR Primer amplifizieren die einzelnen Spacer-Regionen, die zwischen jedem DR-Locus liegen. Die Amplifikate der einzelnen Spacer werden durch dot-blot-Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden (Spacer-Oligonucleotide-Typing) auf einer Membran sichtbar gemacht und fungieren als eine Art Fingerabdruck (KAMERBEEK et al., 1997; VAN DER ZANDEN et al., 2002). Ein Satz von insgesamt 43 einzigartigen Spacer-Sequenzen in der DR-Region

wurde bestimmt, um MTC-Spezies rein nach dem Vorhandensein oder Fehlen dieser Spacer zu klassifizieren (GROENEN et al., 1993; DRISCOLL 2009). Zum Beispiel fehlt bei *M. tuberculosis* typischerweise die Spacer-Sequenz 33-36 in der DR-Region. Auch in *M. bovis* und *M. caprae* fehlen die Spacer-Sequenzen 3, 9 und 16. Bei allen *M.-bovis*-, *M.-caprae*- und *M.-microti*-Stämmen fehlen darüber hinaus die Spacer-Sequenzen 39 bis 43 (ZUMÁRRAGA et al., 1999). Aranaz et al. charakterisierten *M. caprae* durch die fehlenden Spacer 1, 3-16, 30-33 und 39-43 (ARANAZ et al., 2003). Die verschiedenen Muster, die sich durch das Vorhandensein oder Fehlen der 43 Spacer ergeben, können in einem 43-stelligen binären Code zusammengefasst werden. Dabei steht die Zahl 1 für das Vorhandensein und die Zahl 0 für das Fehlen eines Spacers, und daraus ergibt sich ein 15-stelliger Zahlencode, der als Spoligotype bezeichnet wird (DALE et al., 2001; XIA et al., 2016). Eine internationale Datenbank sammelt diese verschiedenen Spoligotype-Muster und ermöglicht eine Zuordnung der verschiedenen eingetragenen Typen (LAZZARINI et al., 2012). Spoligotyping ermöglicht eine leichte Differenzierung zwischen den Spezies (KAMERBEEK et al., 1997; PRODINGER et al., 2002; DRISCOLL 2009) und benötigt als PCR-basierte Methode nur eine geringe Keimzahl, und die DNA kann aus Flüssigkulturen oder direkt aus Isolaten verwendet werden (VAN DER ZANDEN et al., 1998; NEUMEISTER et al., 2009).

### 5.3.5 Differenzierung durch MIRU-VNTR

Kurz nach der Entwicklung des Spoligotypings entdeckte man mit Hilfe der ersten Gesamtgenomsequenzierung im Jahr 1998 (COLE et al., 1998) die „Tandem Repeat Loci“ im Genom von MTC-Mitgliedern. Daraus entstand die sogenannte „Variable Number of Tandem Repeats“- (VNTR-) Genotyping Methode auf Gesamtgenom-Ebene (FROTHINGHAM & MEEKER-O'CONNELL, 1998). Mit der Erweiterung der Methodik durch MIRU-VNTR-Typisierung (MIRU = Mycobacterial Interspersed Repetitive Units), die auch als „Multiple Locus VNTR Analyse“ (MLVA) bezeichnet wird, entstand ein neuer Goldstandard für die molekulare Tuberkulose-Epidemiologie (SUPPLY et al., 2001; 2006). Dieses Verfahren basiert auf der PCR-Amplifikation von mehreren Loci (Genorten), die über das gesamte Genom verteilt vorkommen können, unter der Verwendung von Primern, die spezifisch für die flankierenden Regionen eines jeden Locus sind. In jedem dieser Loci ist eine variable Anzahl von sich hintereinander wiederholenden Sequenzen (VNTR) enthalten, und die Größe des Amplikons ist abhängig von der Anzahl an „Tandem Repeats“ an dem jeweiligen Locus. Dabei kann eine einzelne repetitive Sequenz eine Länge bis zu 100 bp aufweisen (FROTHINGHAM & MEEKER-O'CONNELL, 1998; MAZARS et al., 2001). Die

Größenbestimmung erfolgt entweder durch ein Kapillar-System (SUPPLY et al., 2001; ALLIX et al., 2004), durch Gelelektrophorese (MAZARS et al., 2001) oder durch eine Flüssigkeitschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen (EVANS et al., 2004). Die Anzahl an VNTR per Locus ist zwischen den Mykobakterien-Vertretern sehr unterschiedlich, jedoch für eine Speziesdifferenzierung meist nicht ausreichend diskriminierend, und daher werden mehrere VNTR-Loci gleichzeitig analysiert (NEUMEISTER et al., 2009). Neben den MTC-speziesspezifischen VNTRs gibt es zwölf für mykobakterienspezifische VNTRs, sogenannte MIRUs - wiederholte DNA-Elemente, die inter- und intra-genetisch im Genom verteilt vorkommen (SUPPLY et al., 2000; MAZARS et al., 2001; SOLA et al., 2003). Die Anzahl an VNTR (Kopien pro Locus) kann in numerischen Zahlen wiedergegeben werden und lässt so eine Unterscheidung der Spezies und Subspezies zu (MAZARS et al., 2001; SUPPLY et al., 2001). Eine VNTR-Typisierung ist wesentlich schneller als die IS6110 RFLP-Methodik und ist auch bei niedrigen DNA-Konzentrationen noch anwendbar. Außerdem kann MIRU-VNTR automatisiert mit hohen Durchsatz-Elektrophoresen angewendet werden; dies erfordert dennoch eine zeitaufwändige Laborarbeit aufgrund der zahlreichen PCR-Anwendungen (SUPPLY et al., 2001; KWARA et al., 2003; ALLIX et al., 2004). Für einen weltweiten Probenabgleich wurde eine Datenbank, genannt „MIRU-VNTR plus“, erstellt (WENIGER et al., 2010). Prodinger et al. führten für *M. caprae* eine erfolgreiche MIRU-VNTR-Typisierung anhand von 232 *M.-caprae*-Isolaten durch (PRODINGER et al., 2005).

### 5.3.6 Differenzierung durch Large Sequence Polymorphisms (LSPs)

Aufgrund der Einschränkungen, die das Spoligotyping und die MIRU-VNTR-Typisierung mit sich bringen, wurde nach robusten Alternativen für phylogenetische Anwendungen gesucht. Das Augenmerk lag auf sogenannten „Large Sequenz-Polymorphisms“ (LSPs) (ALLAND et al., 2007) und „Single Nukleotid-Polymorphisms“ (SNPs) zur Genotypen-Differenzierung (FILLIOL et al., 2006; GUTACKER et al., 2006; STUCKI & GAGNEUX, 2013). Die Analyse der LSPs erfolgt entweder mit Hilfe von Mikroarray oder durch PCR (MOSTOWY et al., 2002). LSPs sind Deletionen im Genom von Mykobakterien, die ein unidirektionales Event repräsentieren und irreversibel sind, aufgrund eines sehr seltenen (wie bei *M. tuberculosis*) (SUPPLY et al., 2003) oder komplett fehlenden horizontalen Gentransfers im MTC (GAGNEUX et al., 2006). Eine der ersten Deletionsanalysen erfolgte mit Stämmen des *M.-bovis*-BCG-Impfstammes (BEHR, 2001). Die Größe der LSPs variiert stark zwischen 105 bp und 11.985 bp, und sie treten oft in genomischen Regionen auf, die zu wiederholten

Insertions- und Deletions-Ereignissen neigen und im hohen Maß für die genomischen Variationen des MTC verantwortlich sind (ALLAND et al., 2007). Hirsh et al. beispielsweise identifizierten 68 Genomregionen, die im *M. tuberculosis* H37Rv vorhanden sind, aber in anderen Stämmen fehlen (HIRSH et al., 2004). Später wurden innerhalb des MTC sechs Hauptstammlinien, die auch als „Region of Difference“ (RD-Regionen) bekannt sind, identifiziert (GAGNEUX et al., 2006). Diese Eingruppierungen waren deckungsgleich mit Ergebnissen, die man durch SNP-Analysen erhalten hatte (GAGNEUX & SMALL, 2007). Außerdem ist eine Zuordnung dieser Hauptstammlinien zu einer geographischen Region möglich (GAGNEUX et al., 2006; GAGNEUX & SMALL, 2007). Die Verteilung von 20 variablen Regionen, die aus Insertions- und Deletions-Ereignissen in den Genomen der MTC-Mitglieder entstehen, wurden von Brosch et al. beschrieben (BROSCH et al., 2002). Diese RDs, die ihren Ursprung in synonymen LSPs finden, liegen konserviert in Mitgliedern des MTC vor (BORITSCH et al., 2014). Weiterhin wurden 14 variable RD-Regionen definiert, die eine evolutionäre Einordnung und Differenzierung der MTC-Mitglieder ermöglichen (Abschnitt 3.414) (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002). LSPs zeigten sich für eine phylogenetisch robuste Gruppierung und Darstellung evolutionärer Beziehungen von Mykobakterien sehr nützlich (BROSCH et al., 2002; HIRSH et al., 2004; MOSTOWY et al., 2002; 2004; 2005;). Insbesondere ist eine Klassifizierung durch die Verwendung von LSPs für Isolate mit ungewöhnlichen Spoligotypen, einschließlich derjenigen, die ein hohes Grad an Homoplasie aufweisen, möglich und zeigt, dass Stämme mit identischen Spoligotypen phylogenetisch sehr unterschiedlichen Abstammungslinien angehören (FLORES et al., 2007).

### **5.3.7 Differenzierung durch Single Nucleotide Polymorphismen (SNP)**

Mit der Entdeckung und Entwicklung der Sequenzierungstechnologie gewinnt die Genotypisierung durch „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) (Einzelnukleotid-Polymorphismen) immer mehr an Bedeutung. SNPs haben sich zum genetischen Marker der Wahl bei Human-Genom-Analysen aufgrund ihrer hohen Dichte und ihrer relativ gleichmäßigen Verteilung im Genom entwickelt (CHEN & SULLIVAN, 2003). Auch für Differenzierungen innerhalb des MTC erkannte man bald SNPs aufgrund der fehlenden Rekombination und des lateralen Gentransfers (LGT) als wertvolle phylogenetisch-informative Marker (FILLIOL et al., 2006; GUTACKER et al., 2006; ABADIA et al., 2010; BOUAKAZE et al., 2010). SNPs repräsentieren einzigartige Ereignisse und zeigen fast keine Homoplasie (COMAS et al., 2009). Die Anzahl an entdeckten SNPs innerhalb der MTC-Spezies ist groß, und daher hat sich ein minimaler Satz an SNPs zur Differenzierung bewährt

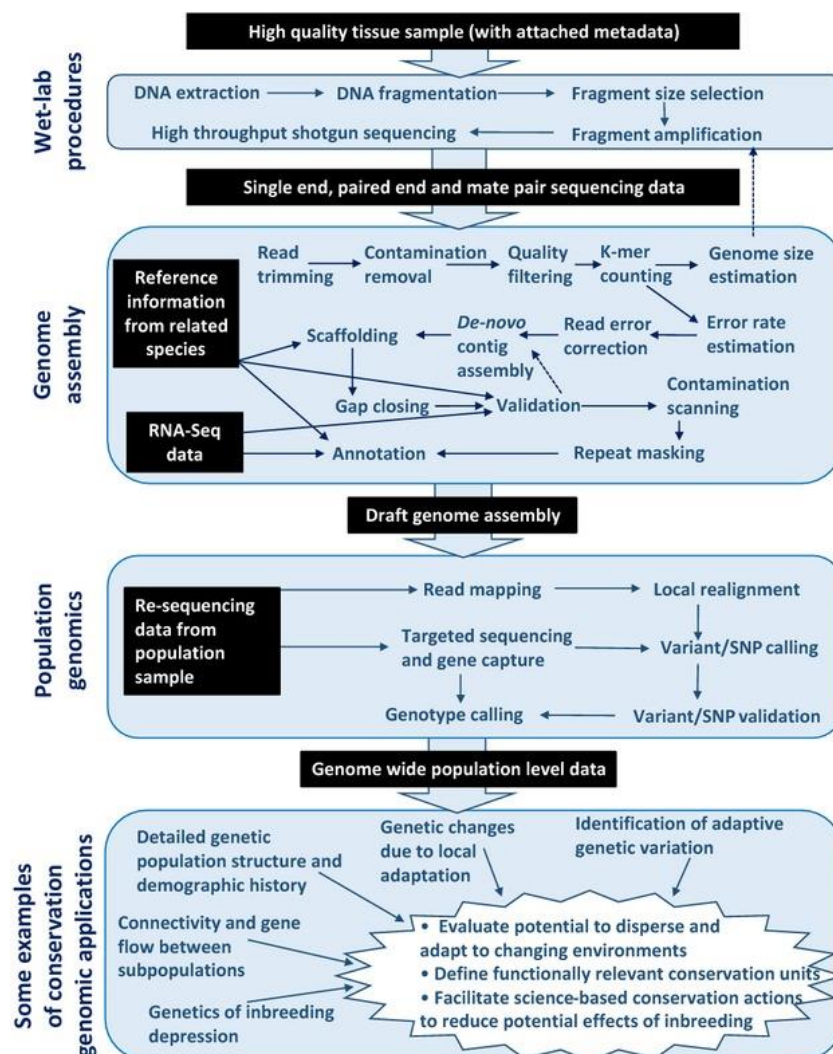
(STUCKI et al., 2012). Bereits 1997 unterteilte Sreevatsan et al. aufgrund von zwei spezifischen SNPs im *gyrA*<sup>95</sup> (ACC→AGC) und *katG*<sup>463</sup> (CTG→CGG) Gen die Mitglieder des MTC in drei primär genetische Gruppen, sogenannte PGGs (principal genotypic groups) (SREEVATSAN et al., 1997). Ein spezifischer SNP im *katG*<sup>463</sup>-locus wird als sichere Detektion des epidemiologisch-wichtigen PGG-1-Stammes verwendet, der als der ursprüngliche Genotyp gegenüber dem PGG-2 und PGG-3 gilt (BOUAKAZE et al., 2010; CHEREDNYK et al., 2013). Frothingham et al. unterteilten diesen PGG-1-Stamm innerhalb des MTC nochmal aufgrund eines zweiten *katG*-Sequenzpolymorphismus, *katG*<sup>203</sup> (ACC→ACT) (FROTHINGHAM et al., 1999). Der MTC präsentiert sich inzwischen in insgesamt sieben phylogenetisch verschiedenen SNP-Clustergruppen (SCGs) mit 5 Untergruppen, die durch einen Satz an SNPs in verschiedenen Genpositionen klassifiziert werden (FILLIOL et al., 2006; ALLAND et al., 2007; BOUAKAZE et al., 2010; CABAL et al., 2014). Folgende weitere wichtige Polymorphismen wurden als Marker für die MTC-Spezies *M. tuberculosis* beschrieben: ein Latin American Mediterranean (LAM) Familie assoziierter SNP im *Ag85C*<sup>103</sup> (GAG → GAA) (GIBSON et al., 2008) plus eine genomische Deletion, als RD Rio bekannt (LAZZARINI et al., 2007), ebenso einige spezifische Polymorphismen im *ogt*<sup>44</sup> (ACC → AGC), *ung*<sup>501</sup> (CTG → CTA) und *mgtC*<sup>182</sup> (CGC → CAC), die als genetische Marker der Haarlem Familie bekannt sind (OLANO et al., 2007; ALIX et al., 2006; CABAL et al., 2014). Inzwischen gibt es zahlreiche Versuchsmethoden, beispielsweise mittels real-time-PCR (HALSE et al., 2011) / Multiplex-PCR (BERGVAL et al., 2008; SENGSTAKE et al., 2014) / Pyrosequencing (CABAL et al., 2014) / SNaPshot minisequencing (BOUAKAZE et al., 2010) / iPLEX-Gold-Technology (BOUAKAZE et al., 2011a), die SNP-Marker nutzen, um Medikamentenresistenzen zu identifizieren (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*), oder MTC-Isolate zu klassifizieren (16S rRNA, *IS6110*, *TbD1*). Auch kann eine genetische Gruppierung mit Hilfe primärer Genotypisierung (*katG*, *gyrA*) oder der Isolate des Haarlem- oder Beijing-Stamm (*ogt*, *mutT2*, *mutT4*) erfolgen (HERSHBERG et al., 2008; BOUAKAZE et al., 2011 b; NASR ESFAHANI et al., 2016; PICHAT et al., 2016). Für *M. caprae*-Isolate sind die typischen Einzelnukleotid-Polymorphismen im *oxyR*-Gen (ESPINOSA et al., 1998), im *gyrB*-Gen (KASAI et al., 2000; NIEMANN et al., 2000) und dem Elongationsfaktor *lepA* beschrieben, (REDDINGTON et al., 2011). Die Punktmutation im Gen der *oxyR*, die im Rahmen der oxidativen Stressantwort als putativer Regulator der Alkaly-Hydroperoxid-Reduktase fungiert, dient neben *M. caprae* auch bei *M. bovis* als Unterscheidungsmerkmal zu anderen MTC-Spezies (ESPINOSA et al., 1998; BROSCHE et al., 2002). Das *gyrB*-Gen codiert die  $\beta$ -Untereinheit der DNA-Gyrase (Topoisomerase-II), ein Enzym, das wesentlich

für die mykobakterielle Replikation verantwortlich ist (KASAI et al., 2000; CHIMARA et al., 2004), und dieser Sequenzpolymorphismus im *gyrB*-Gen dient unter anderem im Geno-Typ-MTBC-Testsystem (Abschnitt 5.3.2) (RICHTER et al., 2003) zur Differenzierung zwischen MTC-Erregergenomen (ARNOLD et al., 2005; DJELOUADJI et al., 2008). Reddington et al. detektierten bei *M. caprae* einen spezifischen SNP im Elongationsfaktor *lepA*-Gen (REDDINGTON et al., 2011).

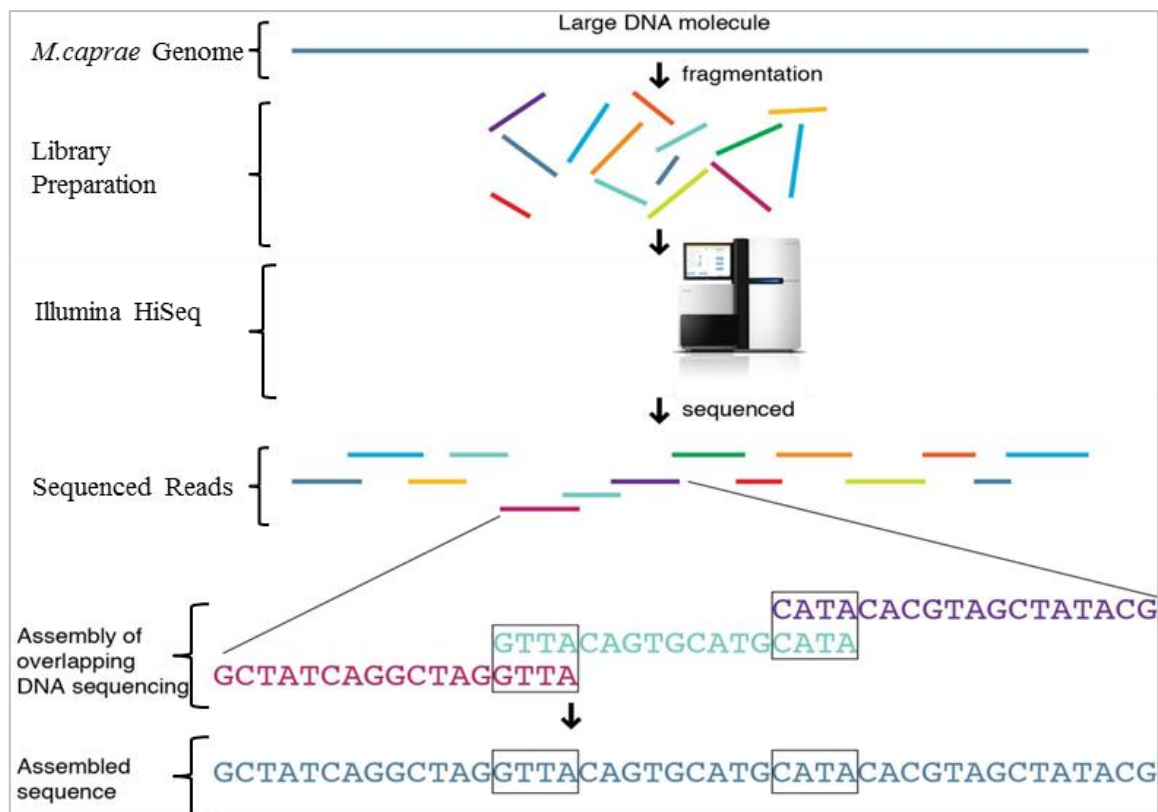
### 5.3.8 Whole Genome Sequencing (WGS) als Differenzierungsmethode

In den letzten Jahren hat die Gesamtgenomsequenzierung (Whole Genome Sequencing, WGS) immer mehr an Bedeutung gewonnen, und neue Sequenzierungsmethoden sind zunehmend verfügbar. Die Auswertung von SNPs und deren phylogenetische Verarbeitung ist erst durch die Sequenzierung des kompletten Genoms von MTC-Isolaten möglich geworden (STUCKI et al., 2012; WALKER et al., 2013 b) und die Preise für die Sequenzierertechnologie sind ebenfalls günstiger geworden. Barcodierte DNA-Sequenz-Bibliotheken ermöglichen eine gleichzeitige Sequenzierung von vielen Isolaten und haben somit einen deutlich höheren Datendurchsatz als die ursprüngliche klassische Methode der Sanger-Sequenzierung (SANGER et al., 1977). Die Gesamtgenomsequenzierung wird auch unter dem Begriff „Next Generation Sequencing“ (NGS) zusammengefasst, und das Prinzip beruht auf der Übermittlung von Signalen, die bei der Sequenzierung-durch-Synthese-Reaktion (sequencing by synthesis, SBS) durch jedes einzelne Nukleotid gesendet werden. Die genomische Sequenz ergibt sich schließlich durch Übersetzung der Signalabfolge. Die Leselänge der einzelnen Reads sind bei NGS-Methoden meist kurz (kurze Reads -> 50 bis 250 bp; mittel-lange -> 500 bis 700 bp) (SHENDURE & JI, 2008; METZKER, 2010; BENJAK et al., 2015), wohingegen die Reads der klassischen Sanger-Methode eine Readlänge von 600-1.000 bp (SANGER et al., 1977) aufweisen. Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten der Sequenzierung und der Genomzusammensetzung (assembly), das „Re-sequencing“ und das „*de-novo*-sequencing“. Die „*de-novo*“-Sequenzierung bezieht sich auf die Konstruktion eines neuen Genoms oder Transkriptoms, dessen Sequenz noch nicht existiert. Die Erstellung einer komplett neuen Genomsequenz (das „Mapping“ und „Assembly“ der Reads) ist in diesem Fall kompliziert, weil es keine Referenzsequenz hierfür gibt, an der man die neue Sequenz ausrichten könnte (Alignment) (DIGUISTINI et al., 2009; BAKER, 2012; BENJAK et al., 2015). Für vergleichende Genomanalysen (z.B. SNP-Analysen) muss ein Referenzgenom verfügbar sein (Re-Sequenzierung der zu untersuchenden Genome und Alignment mit einem Referenzgenom) (BENTLEY, 2006). Die NGS-Durchführung beider Ansätze (Re- vs. *de*-

*novo*-Sequenzierung) ist unterschiedlich. Während für die vergleichende Genomanalyse nur relativ kurze Sequenzen benötigt werden (100-300 Basen), die dann zum Vergleich auf ein bereits annotiertes Referenzgenom gelegt werden können, sind für ein *de-novo*-Genomassembly viel längere Sequenzen (Readlänge über 5 kb) nötig, die dann zu einer vollständigen, lückenlosen Genom-Sequenz zusammengebaut werden können. Die größere Readlänge wird benötigt, um schwierige Bereiche wie Regionen mit vielen Wiederholungen (Repeats) abzudecken (BENJAK et al., 2015). Die Abbildung 8 zeigt die allgemeinen Arbeitsschritte der *de-novo*-Gesamtgenomsequenzierung und in Abbildung 9 ist die Gesamtgenomsequenzierung und das Prinzip des *de-novo*-Genom-Assemblies am Beispiel *M. caprae* dargestellt.



**Abbildung 8: Ablauf einer typischen *de-novo*-Gesamtgenomsequenzierung.** In schwarz gekennzeichnete Kästen zeigen die genomischen Ressourcen, die im Laufe des Projekts verfügbar werden. Die wichtigsten Schritte sind DNA-Aufbereitung, *de-novo*-Assembly, Bioinformatische Ansätze, Postassembly Analysen der genomischen Informationen eines Individuums. Abbildung nach EKBLOM & WOLF, 2014



**Abbildung 9: Prinzip der DNA-Sequenzierung und des *de-novo*-Genom-Assembly.** Aus der *M. caprae*-DNA (Einzelstrang- („single-stranded“-ss) oder Doppelstrang- („double-stranded“-ds) DNA) werden Bibliotheken „Librarys“ entsprechend des Präparationskits hergestellt und anschließend mit Hilfe eines Illumina HiSeq oder MiSeq sequenziert. Die sequenzierten Reads („Paired-end“ Reads oder „Single-end“ Reads) mit einer Länge von 100 bp, werden durch die überlappenden Endsequenzen zusammengelegt. „Paired-end“ Reads haben in der Regel etwa dieselbe Länge, wie „single-end“ Reads, werden aber von beiden Enden des DNA-Fragments sequenziert. Schließlich können die Reads zu einer vollständigen Genomsequenz zusammengebaut werden (Assembly)

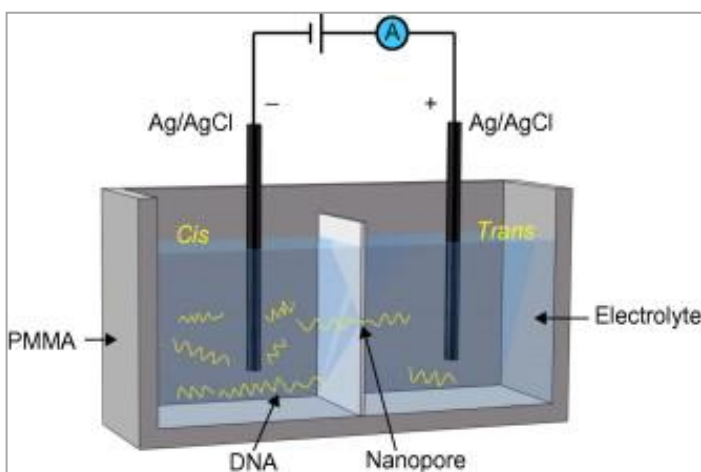
Schürch und seine Kollegen waren die ersten Forscher, die WGS verwendeten, um eine Übertragungskette des *M. tuberculosis*-Haarlem-Clusters nachzuweisen, in dem drei Isolate zugeordnet werden konnten, die in der klassischen DNA-Fingerprinting-Methode nicht zu unterscheiden waren (SCHURCH et al., 2010). Im Jahr 2011 wurde WGS erstmals für eine molekulare Epidemiologie-Studie verwendet, in der neue und historische Isolate eines MIRU-VNTR-Clusters sequenziert wurden und die SNP-Daten anschließend in einer Netzwerkanalyse verglichen wurden (GARDY et al., 2011). Man konnte das sogenannte „Super-Spreader“-Verhalten und zwei verschiedene Abstammungslinien von *M. tuberculosis*



nachweisen. Ein bahnbrechendes Ergebnis erzeugte Walker et al. in ihrer Studie, in der sie die Mutationsrate von 0,5 SNPs/Genom/Jahr für *M. tuberculosis* ermittelten und herausfanden, dass meistens fünf oder weniger SNPs zwischen epidemiologisch verbundenen Tuberkuloseausbrüchen zu finden sind (WALKER et al., 2013a). Eine ähnliche Mutationsrate von 0,3 SNPs/Genom/Jahr wurde von Bryant et al. publiziert, jedoch zeigte sich eine große SNP-Variabilität und kein klarer SNP-Unterscheidungsgrenzwert in ihrer Studie bei Tuberkuloseausbrüchen, die miteinander in Kontakt standen (BRYANT et al., 2013). Roetzer et al. nutzten die Gesamtgenomsequenzierung für einen Ausbruch in Deutschland und ermittelte eine Mutationsrate von 0,4 SNPs/Genom/Jahr (ROETZER et al., 2013). Ford et al. verglichen die Sequenzierungsdaten von MTC-Isolaten aus infizierten Berberaffen und errechneten durch Vergleiche zwischen chronischen Infektionen und aktiven Erkrankungen eine vergleichbare Mutationsrate (FORD et al., 2011). Von besonderer Bedeutung des WGS ist die Entschlüsselung der Gesamtgenome und Erstellung von weltweiten Datenbanken für Genomsequenzen, die für die Diagnostik, Epidemiologie, Evolutionsbiologie und viele andere Anwendungen wichtig sind (ROETZER et al., 2013; PHELAN et al., 2016; WITNEY et al., 2016; FARHAT et al., 2016). Bis jetzt sind nur wenige komplett annotierte Gesamtgenomsequenzen von Mykobakterien publiziert worden, wie beispielsweise *M. tuberculosis* H37Rv (MÉDIGUE et al., 2002), CDC1551 (FLEISCHMANN et al., 2002) und Kurono (MIYOSHI-AKIYAMA et al., 2015), zwei *M.-bovis*-Genome (AF2122/97) (GARNIER et al., 2003) und BCG-Pasteur (BROSCH et al., 2007), *M. leprae* (COLE et al., 2001) und *M.-avium*-Subspezies *paratuberculosis*-Genome, die bisher für *in-vitro*- und *in-silico*-Genomanalysen als Referenz-Sequenzen verwendet wurden. Von *M. caprae* war bisher noch keine komplett annotierte Genomsequenz verfügbar, jedoch sind von La Fuente et al., 2015 Contigs einer *M.-caprae*-Genomsequenz publiziert worden (LA FUENTE et al., 2015 b). WGS wird im weiteren zur Identifizierung von Mischinfektionen durch „multiple *M.-tuberculosis*-MTB“-Stämme (GAN et al., 2016), sowie von Mutationen, die bei der Forschung von Arzneimittelresistenzen (z.B. XDR-TB) wichtig sind, verwendet (CASALI et al., 2012; 2014; KOSER et al., 2013). Diese Studien zeigen das Potenzial der neuen Hochleistungs-Sequenziertechnologie, die ihren Platz in der täglichen Forschung, molekularen Epidemiologie und klinischen Routinearbeit finden wird und auf Dauer bisherige Arzneimittel-Resistenztests und Genotypisierungsmethoden zurückdrängen wird (ALLARD 2016). Jedoch bleiben die arbeitsintensiven Auswertungen und derzeitigen Kosten noch eine mögliche Hürde.

### 5.3.9 Nanopore-Sequencing

Im Jahr 2012 wurde erstmals die Nanopore-DNA-Sequenzierung in einer „Proof-of-Concept“-Veröffentlichung vorgestellt (MANRAO et al., 2012). Gleichzeitig kündigte die Firma „Oxford Nanopore Technologies (ONT)“ an, dass das Unternehmen erfolgreich DNA-Stränge, die zehntausend Kilobasen messen, unter Verwendung der Nanopore-Technologie sequenziert hat (BAYLEY, 2015). Im Jahr 2014 veröffentlichte die Firma ONT eine neue Sequenzier-Plattform, die sogenannte „MinION“ (LU et al., 2016). Durch ihre Portabilität, günstige Anschaffung und Geschwindigkeit in der Datenproduktion eignet sie sich für Echtzeit-Anwendungen (LU et al., 2016). Da es sich bei der Nanopore-Sequenzierung um eine Einzelmolekül-Technik handelt, gibt es keine Obergrenze für die Länge der zu sequenzierenden DNA und auch bei langen DNA-Strängen wird eine gleichbleibende Genauigkeit erhalten. Die Art und Weise, wie die Nanopore-Sequenzierung funktioniert, ist einfach und kostengünstig: Die Nanoporen-Sequenzierung beruht auf einer Potentialänderung, die durch den konstanten Durchfluss von Molekülen durch Protein- oder synthetische Nanoporen mit hohem elektrischen Widerstand hervorgerufen wird. Bei der Einzelstrangsequenzierung wird zunächst ein doppelsträngiger DNA-Strang durch eine Helikase getrennt, und in einem Elektrolytbad wird an beiden Seiten einer künstlich erzeugten Membran, die eine einzelne Nanopore enthält, Spannung angelegt (Abbildung 10). Durch die Spannungsdifferenz wird ein Ionenstrom durch die Nanopore erzeugt und zieht durch Elektrophorese Einzelstrang-DNA in einem linearen Kopf-zu-Schwanz-Modus durch die Nanopore. Durch Anwesenheit der DNA innerhalb der Nanopore wird für einen kurzen Moment der Ionenstrom blockiert, und der Reststrompegel wird gemessen. Dieser liefert Informationen über die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Zielmoleküle (Nukleotide), die momentan die Nanopore blockieren (VENKATESAN et al., 2009).

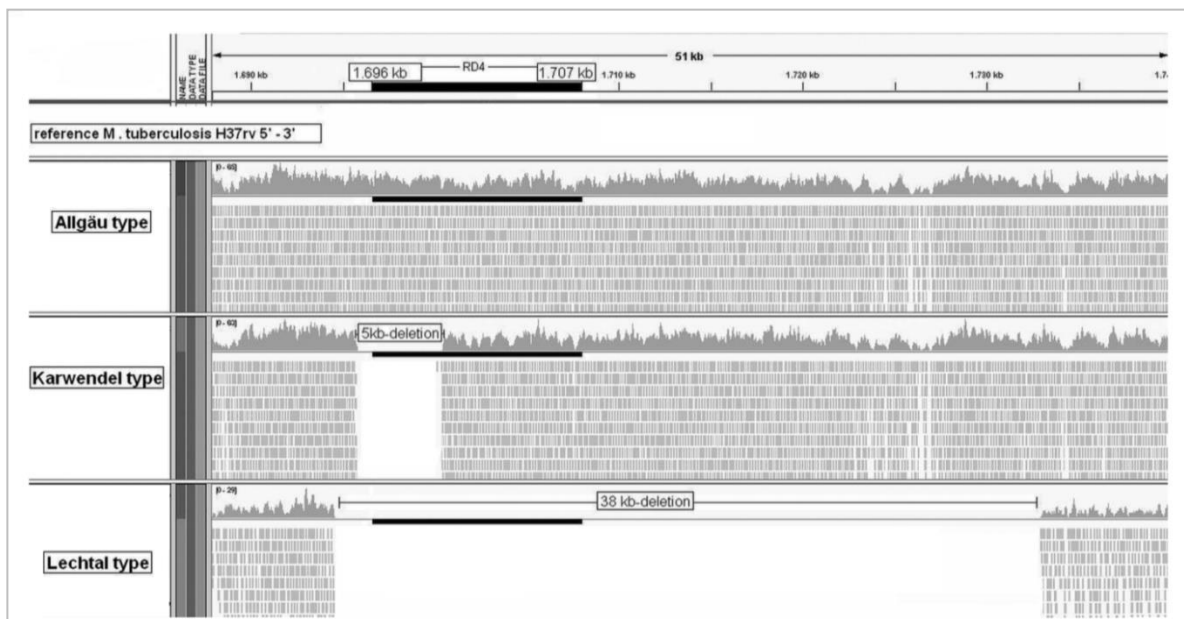


**Abbildung 10:** Schematische Darstellung eines Nanopore-Aufbaus, der den Durchfluss eines DNA-Moleküls durch die Nanopore zeigt (FENG et al., 2015).

Als Nanopore werden sowohl biologische (kleine Transmembranproteine z. B.  $\alpha$ -Hämolysin oder ClpX) (NIVALA et al., 2013) als auch synthetische Poren (aus Siliciumnitrid oder Graphen) sowie halbsynthetische Poren verwendet (FENG et al., 2015). Im Falle einer MspA-Pore befinden sich gleichzeitig vier DNA-Nukleotide innerhalb der Pore (LASZLO et al., 2014; 2016). Durch die spezifischen Potentialänderungen für jedes der vier Nukleotide lässt sich aus dem erhaltenen Datensatz die Sequenz ablesen. Die Geometrie einer Nanopore bestimmt die Erkennungseigenschaft eines Moleküls, und im Fall von MspA ermöglicht es DNA-Sequenzen zu lesen. Jedoch sind Fehler unvermeidlich und eine Studie schätzte die Fehlerquote der MinION-Nanopore-Sequenzierung auf 38 % (LAVER et al., 2015), doch die enormen günstigen und nicht durch die Länge der DNA Stränge limitierten Anwendungsmöglichkeiten verursachen laufend Verbesserungen der Technik und der Computerprogramme zur Erfassung und Auswertung der erhaltenen Datenfülle (STEIN 2015; BATES et al., 2016; WALTER et al., 2016).

### 5.3.10 „Region of Different four” (RD4)–Subtyping

Die Charakteristika der „Region of Different four“ (RD4) der drei *M. caprae*-RD4-Subtypen (Abbildung 11), sowie weitere derzeit noch nicht veröffentlichte Deletionen mit unterschiedlichen Größen im Genom von *M. caprae*-Spezies können bei *M. caprae*-positiven Proben zur Differenzierung von Subtypen innerhalb der Spezies *M. caprae* verwendet werden (DOMOGALLA et al., 2013; RETTINGER et al., 2015; Blum et al., unveröffentlicht).



**Abbildung 11: Sequenzausschnitt aus der Gesamtgenom-Sequenzierung (WGS) von *M. caprae*. In der Abbildung sind die drei RD4-Sequenz-Unterschiede der Subtypen**

(„Allgäu“, „Karwendel“ und „Lechtal“) mit den unterschiedlichen RD4-Deletionsgrößen (5 kb bis 38 kb) dargestellt. Der *M.-caprae*-RD4-Subtyp „Allgäu“ weist eine vollständige RD4-Sequenz auf. Hingegen zeigt der *M.-caprae*-Subtyp „Karwendel“ eine 5-kb große Deletion im flankierenden rechten Teil der RD4-Region mit einem Verlust der Gene Rv1505c bis Rv1509. Eine weitere Deletion von 38 kb konnte im Subtyp „Lechtal“ gezeigt werden, dem die komplette RD4-Region fehlt mit den Genen Rv1504c bis Rv1531. Die Genom-Position (1.696-1.707 kb) der RD4-Region ist mit einem schwarzen Balken markiert (DOMOGALLA et al., 2013)

Die ursprünglichen Differenzierungsmethoden von MTC-positiven Proben, wie beispielsweise nach Halse et al. (HALSE et al., 2011), rein nach dem Kriterium des Vorhandenseins oder Fehlens der RD4-Region, würden zu Fehlinterpretationen zwischen *M. bovis* und *M. caprae* aufgrund der Heterogenität der RD4-Region in *M. caprae* führen (BROSCH et al., 2002; DOMOGALLA et al., 2013). Beide *M.-caprae*-Subtypen „Lechtal“ und „Karwendel“ mit den unterschiedlich großen Deletionen in der RD4-Region würden bei der Verwendung von Primerpaaren, die innerhalb der RD4-Region ansetzen, ein negatives PCR-Ergebnis erzeugen und somit fälschlicherweise für *M.-bovis*-Spezies gehalten werden. Auch bei der Verwendung von RD4-flankierenden Primern nach Taylor et al. (TAYLOR et al., 2007 a; 2007 b) würde ein negatives PCR-Ergebnis zu einer falschen Interpretation führen (DOMOGALLA, 2014). Für die *M.-caprae*-Subtypendifferenzierung nach Domogalla et al. und Rettinger et al. werden insgesamt vier Primerpaare verwendet. Zur Amplifizierung der „internen“ RD4-Region und dem Nachweis des Subtyps „Allgäu“ wird zum einen ein 88 bp großes Fragment aus dem linken Teil der „internen“ RD4-Region und ein 1.031-bp-Fragment aus dem mittleren Teil der „internen“ RD4-Region amplifiziert. Um die 5-kb-Deletion im linken Teil der RD4-Region von *M.-caprae*-Subtyp „Karwendel“ nachzuweisen, wird ein zur „Karwendel“-Deletion flankierendes Primerpaar und Amplifikation eines 700-bp-Fragments verwendet. Der Nachweis der 38-kb großen Deletion und dem daraus resultierten Verlust der kompletten RD4-Region des Subtyps „Lechtal“ erfolgt durch ein 250-bp-Amplifikat, das die flankierenden Sequenzen zu dieser 38-kb Deletion nachweist (DOMOGALLA et al., 2013; RETTINGER et al., 2015). Die RD4-Subtypenunterscheidung nach Domogalla et al. und Rettinger et al. eignet sich gut für differenzierende PCR-Protokolle und erlauben eine schnelle Identifizierung und Differenzierung von *M. caprae*-Subtypen. Weitere, genomweit identifizierbare Deletionen und stabile SNP-Unterschiede könnten zu einer noch genaueren Feindifferenzierung von *M.-caprae*-Isolaten führen, z.B. unter der Verwendung von schnellen Multiplex-PCR-Ansätzen.

### III PUBLIKATIONEN

#### 1 Publikation 1

Gemeinsame Publikation mit Dr. A. Rettinger.

Rettinger, A. et al.

The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for Subtyping *Mycobacterium caprae* Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes

veröffentlicht in *Transboundary and Emerging Diseases* (2015)

#### Zusammenfassung:

Alpine *Mycobacterium-caprae*-Isolate aus Rindern und Rotwild zeigen mindestens drei genetische Variationen im Bereich der RD4-Region, die für eine Differenzierung der *M.-caprae*-Isolaten in die Subtypen „Allgäu“, „Karwendel“ und „Lechtal“ verwendet werden können. Die genomischen Subtypen zeichnen sich dabei durch eine spezifische Nukleotid-Deletion in der 12,7-kb RD4-Region aus. Obwohl *M.-caprae*-Infektionen in Rindern und Rotwild häufig dokumentiert werden, ist nur wenig über mögliche Übertragungswege bekannt. Um Einblick in die molekulare Epidemiologie von *M.-caprae*-Erreger zu bekommen, sind robuste Marker für eine Subtypisierung von *M.-caprae*-Isolaten notwendig. Aus diesem Grund wurde eine schnelle und robuste Multiplex-RD4-PCR entwickelt, die eine gleichzeitige Differenzierung der drei *M.-caprae*-RD4-Subtypen ermöglicht. Dieser Multiplex-RD4-PCR-Ansatz wurde angewendet, um 241 *M.-caprae*-Isolate aus Wild- und Nutztieren aus Bayern und Österreich in die drei RD4-Subtypen zu differenzieren. Alle drei RD4-Subtypen kommen geographisch verteilt vor und wurden in Rind und Rotwild gleichermaßen gefunden. Dies lässt einen Erregeraustausch zwischen diesen beiden Spezies annehmen. Da die RD4-Subtypen in beiden Reservoirwirten genetisch stabil sind, kann gefolgert werden, dass sich die beschriebenen genetischen Variationen innerhalb des Wirts aufgrund einer „Rezeptor-Replikation“ entwickelt haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit empfehlen die genomische RD4-Region als diagnostisch-verlässlichen Marker für eine *M.-caprae*-Subtypen Differenzierung.

## Transboundary and Emerging Diseases

Transboundary and Emerging Diseases

## ORIGINAL ARTICLE

## The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for Subtyping *Mycobacterium caprae* Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes

A. Rettinger<sup>1</sup>, S. Broeckl<sup>2</sup>, M. Fink<sup>3</sup>, W. M. Proding<sup>4</sup>, H. Blum<sup>5</sup>, S. Krebs<sup>5</sup>, J. Domogalla<sup>6</sup>, F. Just<sup>2</sup>, S. Gellert<sup>2</sup>, R. K. Straubinger<sup>1</sup> and M. Büttner<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, LMU Munich, Munich, Germany

<sup>2</sup> Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany

<sup>3</sup> Austrian Agency for Health and Food Safety, Institute for Veterinary Disease Control, Moedling, Austria

<sup>4</sup> Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

<sup>5</sup> Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, Munich, Germany

<sup>6</sup> Bavarian Environment Agency, Wielenbach, Germany

### Keywords:

*Mycobacterium caprae*; RD4; molecular epidemiology; cattle; red deer

### Correspondence:

A. Rettinger, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, LMU Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany. Tel.: +49 (0)89 2180 5899; Fax: +49 (0)89 2180 99 2528; E-mail: .anna.rettinger@micro.vetmed.uni-muenchen.de

Received for publication May 21, 2015

doi:10.1111/tbed.12438

### Summary

Alpine *Mycobacterium caprae* isolates found in cattle and red deer display at least three genetic variations in the region of difference four (RD4) that can be used for further differentiation of the isolates into the subtypes 'Allgäu', 'Karwendel' and 'Lechtal'. Each genomic subtype is thereby characterized by a specific nucleotide deletion pattern in the 12.7-kb RD4 region. Even though *M. caprae* infections are frequently documented in cattle and red deer, little is known about the transmission routes. Hence, robust markers for *M. caprae* subtyping are needed to gain insight into the molecular epidemiology. For this reason, a rapid and robust multiplex PCR was developed for the simultaneous detection of three *M. caprae* RD4 subtypes and was used to subtype a total number of 241 *M. caprae* isolates from animals (145 cattle, 95 red deer and one fox) from Bavaria and Austria. All three subtypes occur spatially distributed and are found in cattle and in red deer suggesting transmission between the two species. As subtypes are genetically stable in both species it is hypothesized that the described genetic variations developed within the host due to 'within-host replication'. The results of this study recommend the genomic RD4 region as a reliable diagnostic marker for *M. caprae* subtype differentiation.

### Introduction

*Mycobacterium caprae* was first described by Aranaz et al. (1999) and was classified as a new species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) in 2003 (Aranaz et al., 2003). A species differentiation model among members of the MTC is characterized by specific deletions of 14 regions of difference (RDs) within the MTC genome (Brosch et al., 2002). *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) and *M. caprae* are thereby distinguished by the loss of the RD4 in *M. bovis*. However, we and others (Rodríguez et al., 2011; Domogalla et al., 2013) found that substantial variation in the genomic RD4 region is present in

*M. caprae* strains. Therefore, we considered the described discrimination scheme (Brosch et al., 2002) for *M. caprae* as unreliable. Whole-genome sequence data recently demonstrated that three *M. caprae* subtypes, 'Allgäu', 'Lechtal' and 'Karwendel', co-exist in the German and Austrian Alps (Domogalla et al., 2013). The three subtypes were characterized by genomic variations in the region of difference four (RD4) (Domogalla et al., 2013). RDs, or synonymous large sequence polymorphisms (LSP), are known to be conserved among the members of the MTC (Boritsch et al., 2014), but little is known about the putative gene functions. Recent reviews have addressed the role of *M. caprae* in bovine tuberculosis (bTB) (Rodríguez-



Campos et al., 2014) and as a human pathogen (Proding et al., 2014). Persistent tuberculosis exists in different wildlife species and increases the risk of bTB transmission between wildlife and cattle (Hardstaff et al., 2013). Reservoir hosts for bTB include the Eurasian badger (*Meles meles*) in the UK and Ireland (Bielby et al., 2014; Byrne et al., 2014), the European wild boar (*Sus scrofa*) in Spain (Naranjo et al., 2008) and red deer (*Cervus elaphus*) in the Alps (Fink et al., 2015). As described by Gormley et al. (2014), stable markers for accurate discrimination of isolates are the key to gain knowledge of the infection transmission of a pathogen.

To further analyse the epidemiology of *M. caprae* in the Alpine region, isolates from 145 cattle and 95 red deer were subtyped to evaluate (i) whether the RD4 region is a stable marker for *M. caprae* subtyping, (ii) whether the subtypes occur spatially distributed (iii) and whether genetic variations evolved due to 'within-host replication' or due to a 'spillover' event.

Examining a large number of *M. caprae* isolates, we were able to show that the RD4 provides a solid basis for *M. caprae* subtyping by the use of a multiplex PCR protocol. The three *M. caprae* subtypes are spatially distributed and are found in three geographical regions: The Upper Allgäu, the Karwendel Mountains and around the Tyrolean Lech valley. As the subtypes are genetically stable in both host species, we assume that RD4 variations arose due to long-term 'within-host replication'.

## Materials and Methods

### Mycobacterial cultivation

For bacteriological cultivation, two to three grams of pathological suspicious tissue material (mainly lung, liver, intestine, spleen, kidney and the corresponding lymph nodes) was homogenized in five millilitre (ml) NaCl

solution (0.9%) using the IKA Ultra Turaxx® Tube Drive System (IKA®, Staufen, Germany). The suspension was decontaminated with 1% N-Acetyl-L-Cystein-NaOH solution in a total volume of 20 ml and neutralized after incubation for 25 min with 20 ml phosphate buffer (pH 6.8) as recommended by the 'World Organization for Animal Health' (OIE) (2012) Manual (Austria) and the 'Method Collection' (Germany) (OIE Terrestrial Manual, 2012, Federal Research Institute for Animal Health, January 2014). The solution was centrifuged for 20 min at 3300 × g. The supernatant was discarded. To obtain a uniform bacterial distribution, the sediment was resuspended in 0.5 ml phosphate buffer (pH 6.8) and 200 µl of the suspension was plated on two different solid media: (i) Stonebrink medium including polymyxin B, amphotericin B, carbenicillin and trimethoprim (PACT) and (ii) Lowenstein-Jensen medium with glycerine and PACT (Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Germany). Cultures were incubated for 8 weeks (Germany) or 12 weeks (Austria) at 37°C. Media were frequently screened for bacterial growth. Additionally, mycobacteria were grown in liquid medium Middlebrook 7H9 broth base supplemented with MGIT Growth Supplement (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) using the BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Becton Dickinson). Bacterial growth is automatically measured by turbidity increase of the liquid media. If possible, single colonies of the culture material were used for species identification (see section below) and extracted DNA from the culture material was used for the multiplex PCR assay.

### Multiplex PCR protocol for RD4 subtyping

DNA extraction methods for mycobacteria grown in liquid and solid media and PCR primers (Table 1) were used as previously described (Domogalla et al., 2013). *M. caprae* subtype differentiation is based on subtype-specific

**Table 1.** Primers used for RD4 subtyping in multiplex PCR. 'F' denotes the forward primer, while 'R' denotes the reverse primer

PCR type	Nucleotide sequence (5' to 3')	PCR fragment size	RD4 subtype
Internal left part-F	CCACGACTATGACTAGGACAGCAA	88 bp	Allgäu
Internal left part-R	AAGAACTATCAATCGGGCAAGATC		
Internal central part-F	GTGCGCTCCACCCAAATAGTTGC	1031 bp	Allgäu/Karwendel
Internal central part-R	TGTCGACCTGGGGCACAAATCAGTC		
38-kb deletion flanking-F	GAAGGAAGCGGCTGCGATTGTGTC	250 bp	Lechtal
38-kb deletion flanking-R	TGGTAACACGCTCGGCAGTCA		
5-kb deletion flanking-F	CTCGTCGAAGGCCACTAAAG	700 bp	Karwendel
5-kb deletion flanking-R	TTCGTAGCCGCACATCCATGA		

RD4 subtype-specific nucleotide deletion patterns: (i) 'Allgäu' subtype: complete sequence of RD4 conserved; subtype-specific PCR fragment size: 1031 bp and 88 bp. (ii) 'Lechtal' subtype: 38-kb nucleotide deletion comprising the complete RD4; subtype-specific PCR fragment size: 250 bp. (iii) 'Karwendel' subtype: 5-kb nucleotide deletion in the left part of the RD4; subtype-specific PCR fragment size: 1031 bp and 700 bp.

A. Rettinger et al.

*M. caprae* RD4 Subtyping and Epidemiology

nucleotide deletion pattern. While the 'Allgäu' subtype displays the complete RD4 sequence (internal left part PCR, Table 1), a 5-kb deletion is present in the genome of the 'Karwendel' subtype (5-kb deletion-flanking PCR, Table 1) and of 38-kb deletion in the 'Lechtal' subtype (38-kb deletion PCR, Table 1). The internal central RD4-PCR was used as an additional proof for the 'Allgäu' and 'Karwendel' subtype (Table 1). The conventional PCR protocols developed by Domogalla et al. (2013) were improved to obtain a multiplex PCR protocol. All reactions were run in one reaction tube using a T3000 thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). Reactions were carried out in a total volume of 50 µl. PCRs contained 0.05 U of HotStarTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), reaction buffer, Q solution, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.3 µM each primer (Domogalla et al., 2013) and 0.1–5 ng/µl template DNA and were adjusted to a final volume of 50 µl with RNase-free water. Cycling parameters were as follows: one pre-denaturation step for 15 min at 95°C; followed by 35 cycles of one minute at 94°C, 60°C for one minute and 72°C for one minute; and a final elongation step for 10 min at 72°C. PCR products were separated in a 1.5% agarose gel (1 × TAE) at 100 V for one hour and visualized under UV light using ethidium bromide for DNA staining.

#### Specificity and sensitivity of the multiplex PCR assay

Mycobacterial DNA used for the evaluation of the assay's specificity and sensitivity originated from field isolates (cattle, red deer). MTC's species identification of all isolates was performed with the commercial test kit GenoType<sup>®</sup> MTBC or GenoType<sup>®</sup> CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). To confirm first the specificity of the developed multiplex PCR, DNA from three *M. bovis*, two *M. avium* spp. *paratuberculosis* and atypical Mycobacteria (two *M. kansasii* and one *M. chelonae*) isolates was used. *M. caprae* DNA solutions representing each RD4 subtype ('Allgäu', 'Lechtal' and 'Karwendel') were used as positive controls. After DNA amplification, PCR products were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels in Tris-acetate EDTA (1 × TAE) buffer at 90 V for one hour. DNA was stained with ethidium bromide and visualized with UV light.

The sensitivity of the PCR assay was confirmed by amplifying log<sub>10</sub> serial dilutions of mycobacterial DNA extracted from the RD4 subtype 'Allgäu' with the multiplex PCR. DNA fragments were visualized as described above.

#### *Mycobacterium caprae* species identification of the investigated samples

Species identification of the 241 investigated *M. caprae* isolates was performed using the commercial test kit

GenoType<sup>®</sup> MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). For *M. caprae* species identification, culture material was processed according to the manufacturer's instructions.

#### MIRU-VNTR genotyping and spoligotyping

As recently shown by Domogalla et al. (2013), genotyping of twelve Bavarian *M. caprae* isolates (six red deer, one roe deer, four cattle and one sheep) matched the consensus mycobacterial interspersed repetitive unit – variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR) type. To proof if this method can also be applied for Austrian isolates, genotyping was performed with a subset of *M. caprae* isolates. Twenty-four isolates from cattle and 16 isolates from red deer were analysed. Spoligotyping was carried out according to Kamerbeek et al. (1997), and resulting spoligotypes were assigned according to the numbering on the Mbovis.org website (Smith and Upton, 2012). MIRU-VNTR genotyping was based on 24 loci (Supply et al., 2006) and was performed with single PCRs followed by gel electrophoresis analysis as described (Prodinger et al., 2005). Data were compared using BIONUMERICS software (version 6.6; Applied Maths, St. Martens, Belgium). MIRU-VNTR copy numbers were compared with consensus types described earlier for the RD4 subtypes 'Allgäu', 'Lechtal' (spoligotype SB0418) and 'Karwendel' (spoligotype SB2174) (Domogalla et al., 2013).

#### Sampling in cattle herds and basic laboratory procedure for *Mycobacterium caprae* isolation

Infection with *M. caprae* or *M. bovis* in cattle is a notifiable animal disease in Germany and Austria (both countries are declared officially free of bovine tuberculosis). Therefore, sample collection was performed according to specific National legislation in Germany (RindTbV 2013, current status 2014) and Austria (RindTbV 2008, current status 2014). Sampling from animals in cattle herds and organ inspection was initiated in accordance with the result of the single intradermal comparative skin testing (SCITT). Cattle that showed no negative (Austria) or positive results (Germany) in the SCITT had to be culled or slaughtered. Animals with questionable SCITT results were retested after 6 weeks (only Germany). Samples from organs showing suspicious lesions after meat inspection or macroscopic pathology had to be sent to the authorized governmental laboratory for further investigations. Accredited laboratory diagnostics are based on a protocol according to the national specific law (OIE) manual (Austria) and the 'Method Collection' (Germany) (OIE Terrestrial Manual, 2012, Federal Research Institute for Animal Health, January, 2014). The principal working procedure in both countries is



as follows: subsets of organs (mainly lung, liver, intestine, spleen, kidney and the corresponding lymph nodes) were analysed with a real-time PCR (different PCRs in Austria and Germany, regulated by law) to detect MTC-DNA in the sample material. PCR-positive organs were further analysed by bacteriological cultivation. Species identification of culture isolates was performed with the GenoType® MTBC test kit. In Bavaria, a total number of 886 cattle were examined for bTB between March 2013 and July 2014. In this study, 70 culture isolates from cattle were confirmed as '*M. caprae* positive' with the GenoType® MTBC test kit and were further analysed by RD4 subtyping. Our 70 investigated animals originated from 54 cattle farms. In 40 farms, one animal was infected, two animals per herd were infected in 13 farms and in one case, four animals of the investigated farm were infected. Additionally, 45 Austrian isolates and DNA from two Spanish cattle were RD4 subtyped.

In addition, 28 bovine isolates that had been collected from bTB cases between 1999 and 2008 in Bavaria were recultivated and further investigated by RD4 subtyping.

#### Workflow for the sampling in red deer and other wildlife

Sampling of red deer and other wildlife species was organized and funded as part of different national monitoring programmes (see Acknowledgements). Monitoring programmes were performed on a voluntary basis. Each county that is displayed in Fig. 3 sent defined numbers of hunted red deer to the responsible authority for pathological examination of the carcasses, followed by culture examination of suspicious organs (mostly lung tissue, intestine and the corresponding lymph nodes). Samples were collected during the hunting seasons 2011/2012 (Austria), 2012/2013 and 2013/2014. In Bavaria, the regular hunting season for red deer takes place between June and January of the following year. In Austria, the hunting season for red deer is between July and December. In this study, we investigated total numbers of 57 and 38 *M. caprae* culture isolates from Bavaria and Austria by RD4 subtyping, respectively.

Other wildlife species were collected during the two hunting seasons of 2012/2013 and 2013/2014 in Germany: badgers (*Meles meles*,  $n = 40$ ), chamois (*Rupicapra rupicapra*,  $n = 161$ ), roe deer (*Cervus elaphus*,  $n = 64$ ), foxes (*Vulpes vulpes*,  $n = 59$ ) and marmots (*Marmota marmota*,  $n = 23$ ) (Müller et al., 2014). One *M. caprae* isolate from a fox was analysed by RD4 subtyping.

#### Epidemiology of *Mycobacterium caprae* RD4 subtypes in the Alps

Rough geographical locations of affected cattle were determined by the sites of the cattle farms (Germany) or by the

farm registration number (Austria) and that of affected red deer by the geographical location where the animal was hunted. Hunters indicated quadrants (25 km<sup>2</sup>) in maps (Germany) or by geographical coordinates (Austria) representing the hunting region where red deer samples had been collected.

## Results

### Cultivation of *Mycobacterium caprae*-containing tissue samples

A total number of 241 animals were examined by culture for this study. Culture material was obtained from 145 cattle, 95 red deer and one fox. Samples showed bacterial growth after 4–8 weeks of incubation on solid and/or liquid media. Single colonies from these cultures were used for further investigation.

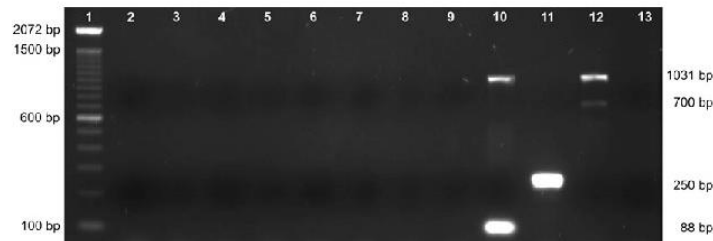
### RD4 subtyping by multiplex PCR

RD4 subtyping was carried out with DNA from 241 *M. caprae* isolates (145 cattle, 95 red deer and one fox). Using the new PCR multiplex protocol, all isolates could clearly be assigned to one of the three RD4 subtypes 'Allgäu', 'Lechtal' or 'Karwendel'. All isolates displayed the subtype-specific PCR fragment sizes as shown in Table 1 and the expected bands in gel electrophoreses as shown in Fig. 1. Briefly, the 'Allgäu' and 'Karwendel' subtypes produce a common band at 1031 bp but were identified by a 'Allgäu'-specific fragment (88 bp) and a 'Karwendel'-specific fragment (700 bp). For the subtype 'Lechtal', the PCR protocol results in amplification of a single specific 250-bp fragment.

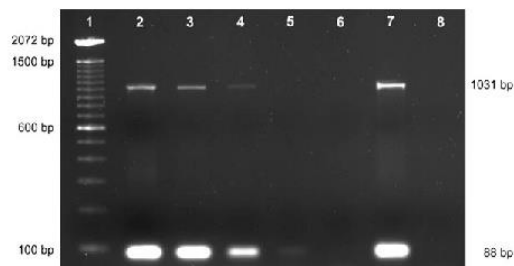
### Specificity and sensitivity of the multiplex PCR

To confirm specificity of the developed multiplex PCR, DNA from three *M. bovis*, two *M. avium* spp. *paratuberculosis* and atypical *Mycobacteria* (two *M. kansasii*, one *M. chelonae*) isolates was tested (Fig. 1). The assay produced amplicons of the expected size only for the three *M. caprae* subtype-positive controls ('Lechtal', 'Allgäu' and 'Karwendel'). No signals were observed for *M. bovis* and the other mycobacterial isolates that do not belong to the MTC (Fig. 1).

The sensitivity of the PCR assay was assessed with serial dilutions, of *M. caprae* DNA. Starting with the highest concentration at 1 ng/μl, all further log10 dilutions were detected down the lowest concentration at 5–10 pg/μl (Fig. 2). This results proofs that the multiplex assay is a sensitive and specific method for detecting and subtyping *M. caprae* culture isolates.



**Fig. 1.** Reactivity of mycobacterial template DNA other than *Mycobacterium caprae* in the multiplex PCR. Quantity of template DNAs in brackets; Lane 1: 100-bp DNA ladder (Thermo Scientific™, Darmstadt, Germany); Lane 2: *M. kansasii* DNA (3.5 ng/μl); Lane 3: *M. kansasii* DNA (4 ng/μl); Lane 4: *M. bovis* (2.1 ng/μl); Lane 5: *M. bovis* (10 ng/μl); Lane 6: *M. bovis* (17 ng/μl); Lane 7: *M. avium* spp. *paratuberculosis* (1.7 ng/μl); Lane 8: *M. avium* spp. *paratuberculosis* (0.2 ng/μl); Lane 9: *M. chelonae* (4 ng/μl); Lane 10: PC 1; positive controls (*M. caprae* subtype 'Allgäu', 0.04 ng/μl); Lane 11: PC 2 (*M. caprae* subtype 'Lechtal', 0.6 ng/μl); Lane 12: PC 3 (*M. caprae* subtype 'Karwendel', 0.05 ng/μl); and Lane 13: NT = non-template control (all PCR components except template DNA).



**Fig. 2.** Sensitivity of the *Mycobacterium caprae* RD4 subtyping multiplex PCR protocol using subtype 'Allgäu' (complete RD4 sequence). *M. caprae* DNA, used for serial dilution, originates from field isolates (species confirmation was carried out with the GenoType® MTBC test kit). Lane 1: 100-bp DNA ladder (Thermo Scientific™, Darmstadt, Germany); Lane 2: undiluted *M. caprae* DNA (1 ng/μl); Lane 3: 1 : 10 dilution; Lane 4: 1 : 100 dilution; Lane 5: 1 : 10.00 dilution; Lane 6: 1 : 1 × 10<sup>4</sup> dilution; Lane 7: PC1 (*M. caprae* subtype 'Allgäu', 0.04 ng/μl); and Lane 8: NTC, non-template control (all PCR components except template DNA).

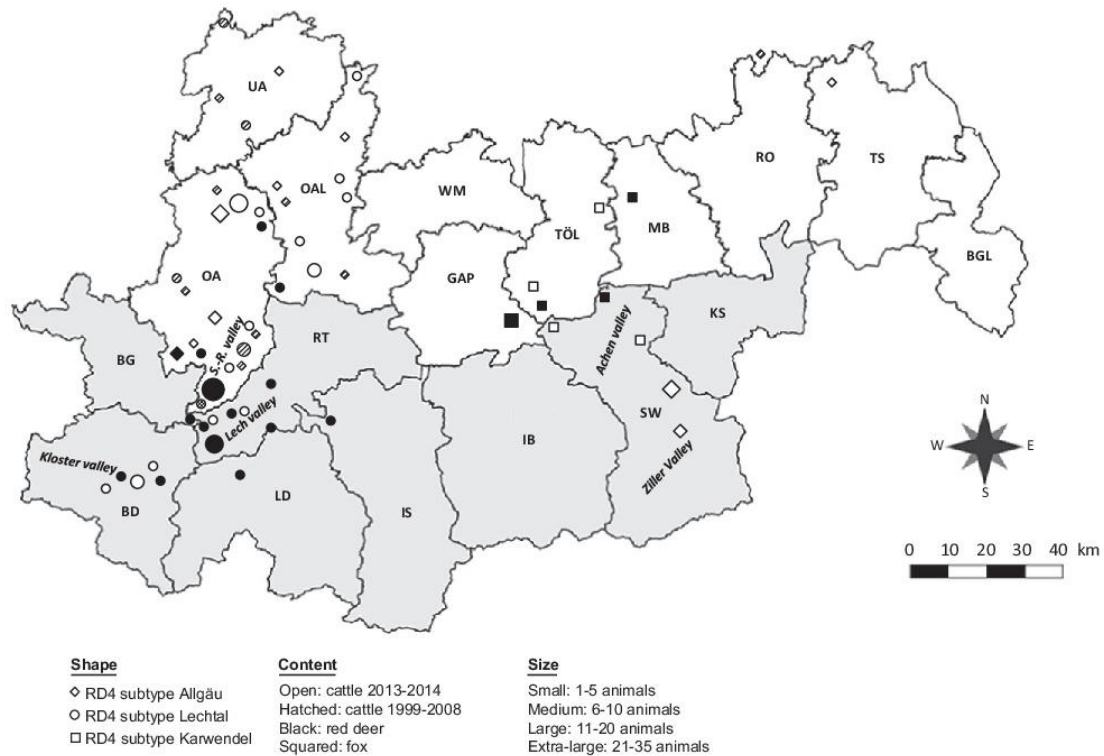
#### MIRU-VNTR genotyping and spoligotyping

To further validate the method, a subset of 40 Austrian *M. caprae* isolates (24 from cattle, 16 from red deer, altogether 48% of the Austrian isolates) were genotyped by MIRU-VNTR and spoligotyping to investigate whether RD4 subtyping matched with standard genotyping methods. For the 20 'Allgäu'- and 17 'Lechtal'-type isolates, MIRU-VNTR genotypes were identical and perfectly congruent with the RD4 subtypes identified by multiplex PCR, respectively. Two of three 'Karwendel' isolates, both from cattle, showed the same single locus variant by MIRU-VNTR (in MIRU 26), the single red deer 'Karwendel'-type isolate matched the consensus MIRU-VNTR type (Table S1). As expected, spoligotype SB0418 was found for all 'Allgäu'- and 'Lechtal'-type isolates and SB2174 for all 'Karwendel' isolates (Table S1).

#### Geographical occurrence of *Mycobacterium caprae* in cattle

Between March 2013 and July 2014, a total number of 886 cattle were tested for bTB in Bavaria. One hundred and five animals (11.9%) were confirmed as *M. caprae* infected. The highest infection rate was detected in the area of Allgäu comprising the counties Lower (UA), Upper (OA) and Eastern Allgäu (OAL; see Fig. 3 and Table 2). All *M. caprae* subtypes could clearly be associated to two defined geographical areas in the Bavarian Alps. The predominant subtypes 'Allgäu' ( $n = 32$ ; 45.7%) and 'Lechtal' ( $n = 36$ ; 51.4%) are both found in the area of Allgäu. In contrast, the 'Karwendel' subtype ( $n = 2$ ; 2.9%) was exclusively found in two cattle from Bad Tölz (TÖL; Table 2 and Fig. 3). The same geographical subtype distribution was identified for the 28 bovine isolates from outbreaks between 1999 and 2008 (Fig. 3). The 'Allgäu' ( $n = 11$ ) and 'Lechtal' subtypes ( $n = 14$ ) were found in the Allgäu area, whereas three 'Allgäu' isolates originated from the area nearby the city of Landshut (LA), a region relatively far away from the affected areas (Table 2, and Fig. 3). These three cases were discovered in the year 1999. Cattle trade could not be traced back for that time. Therefore, it cannot be determined with certainty if the affected cattle originated from the Allgäu. In Austria, cattle has been tested for bTB since 2008 in and around the upper Lech valley, where red deer has been identified as a reservoir for bTB (Fink et al., 2015). Nineteen isolates were subtyped as RD4 subtype 'Lechtal' comprising six animals of the Tyrolean Lech valley and 13 animals of a neighbouring location in the province of Vorarlberg (Kloster valley in the District of Bludenz (BD), Fig. 3). Another 23 *M. caprae* isolates originating from an outbreak in three farms in the Tyrolean Ziller Valley in the District of Schwaz (SW) were subtyped as 'Allgäu' (Fig. 3). This outbreak was traced back to cattle imported from Bavaria. Mycobacteria isolated from three cows which





**Fig. 3.** Spatial distribution of RD4 subtypes in cattle and red deer. Background colour: Light grey, Austrian territory; White, Bavarian Territory. UA, Lower Allgäu; OAL, Eastern Allgäu; OA, Upper Allgäu; WM, Weilheim-Schongau; GAP, Garmisch-Partenkirchen; TÖL, Bad Tölz; MB, Miesbach; RO, Rosenheim; TS, Traunstein; BGL, Berchtesgadener Land; BG, Bregenz; BD, Bludenz; RT, Reutte; LD, Landeck; IS, Imst; IB, Innsbruck Land; SW, Schwaz; KS, Kufstein, S.-R. Valley, Stillach-Rappental Valley.

were summered on Alpine pastures in the Achen valley in the Karwendel Mountains were subtyped as 'Karwendel' (Table 2, Fig. 3). In addition, subtyping of two Spanish cattle isolates (Table 2) revealed a complete RD4 sequence characteristic for the 'Allgäu' subtype.

#### Geographical occurrence of *Mycobacterium caprae* in red deer and other wildlife species

In Bavaria, 57 of 2933 red deer samples (1.9%) were confirmed as *M. caprae* positive. No *M. caprae* infection was detected in 386 hunted red deer in the eastern part of the Bavarian Alps, namely the counties of Rosenheim (RO), Traunstein (TS) and Berchtesgadener Land (BGL). An accumulation of cases was found in the area of Upper Allgäu (OA), where both the 'Lechtal' and 'Allgäu' subtypes were identified. The 'Lechtal' subtype was the predominant subtype ( $n = 39$ ; 68.4%) followed by the 'Karwendel' subtype ( $n = 10$ ; 17.5%) and the 'Allgäu' subtype ( $n = 8$ ; 1.4%) (Table 3). Only one *M. caprae* isolate was recovered

from wildlife species other than red deer, *that is*, from a fox. The *M. caprae* isolate of the fox that was hunted in the south-western area of Allgäu was identified as 'Lechtal' subtype (Table 3, Fig. 3). The 'Karwendel' subtype occurred exclusively in the Karwendel Mountains, and no other *M. caprae* subtype was detected in this area (Fig. 3).

Samples from wildlife species did not yield *M. caprae* isolates.

All 34 *M. caprae*-infected red deer found in the determined hotspot area (Fink et al., 2015) were subtyped as 'Lechtal'. Twenty-seven of these animals came from the Tyrolean Lech valley and seven animals from adjacent locations in Tyrol and Vorarlberg including the Kloster valley. Since 2013, bTB monitoring is performed at the Austrian side of the Karwendel Mountains, an area which includes the Achen valley. All four *M. caprae* isolates from red deer found in the Achen valley and in the Karwendel Mountains were typed as 'Karwendel' subtype (Table 3 and Fig. 3), which is in accordance to the epidemiological situation on the Bavarian side of the Karwendel Mountains region.

A. Rettinger et al.

*M. caprae* RD4 Subtyping and Epidemiology**Table 2.** RD4 subtyping results pertaining *Mycobacterium caprae* isolates from Bavarian and Austrian cattle

Sampling period	Animal species	Geographical location	Positive animals	RD4 subtype		
				Allgäu	Lechtal	Karwendel
1999–2008	Cattle <sup>a</sup>	LA	3	3		
		OA	9	4	8	
		UA	10	4	6	
		OAL	6	3		
		Total	28	14	14	
03/2013–07/2014	Cattle <sup>a</sup>	OA	49	27	22	
		OAL	17	3	14	
		UA	1	1		
		MÜ	1	1		
		TÖL	2			2
	Total		70	32	36	2
2011–2014	Cattle <sup>b</sup>	Lech Valley–Tyrol	6		6	
		Voralberg	13		13	
		Achen valley in Karwendel region	3			3
		Ziller Valley	23	23		
		Total	45	23	19	3
2012	Cattle	ES	2	2		

LA, Landshut; OA, Upper Allgäu; OAL, Eastern Allgäu; UA, Lower Allgäu; MÜ, Mühldorf; TÖL, Bad Tölz; Lechtal-Tyrol, District of Reutte; Voralberg includes the Districts of Bregenz and of Bludenz; Achen Valley and Ziller Valley, District of Schwaz; ES, Spain.

<sup>a</sup>*M. caprae* isolates Bavarian cattle; <sup>b</sup>*M. caprae* isolates Austrian cattle.

**Table 3.** RD4 subtyping results from red deer and wildlife *Mycobacterium caprae* isolates from Bavaria and Austria

Sampling period	Animal species	Geographical location	Positive animals	RD4 subtype		
				Allgäu	Lechtal	Karwendel
2012–2014	Red deer <sup>a</sup>	OA	46	8	38	
		OAL	1		1	
		TÖL	1			1
		MB	1			1
		GAP	8			8
		Total	57	8	39	10
2011–2014	Red deer <sup>b</sup>	Lech Valley–Tyrol	27		27	
		Voralberg	7		7	
		Achen valley in Karwendel region	4			4
		Total	38	0	34	4
2013	Fox <sup>a</sup>	OA	1		1	

OA, Upper Allgäu; OAL, Eastern Allgäu; TÖL, Bad Tölz; MB, Miesbach; GAP, Garmisch-Partenkirchen; Lechtal-Tyrol, District of Reutte; Voralberg includes the Districts of Bregenz and of Bludenz; Achen Valley and Ziller Valley, District of Schwaz.

<sup>a</sup>*M. caprae* isolates Bavaria; <sup>b</sup>*M. caprae* isolates Austria.

#### Spatial distribution of the three RD4 subtypes 'Allgäu', 'Karwendel' and 'Lechtal'

By investigating a large number of *M. caprae* isolates, it became evident that the 'Lechtal' and 'Allgäu' subtypes are

common in cattle and red deer in the three areas of Allgäu, Lower Allgäu (UA), Upper Allgäu (OA) and Eastern Allgäu (OAL). The 'Lechtal' subtype was also found in cattle and red deer in the adjacent Austrian regions Bludenz (BD), Bregenz (BG) and Reutte (RT) (Fig. 3). This is in

accordance with previous findings where the 'Lechtal' subtype was described for the first time in red deer and cattle from the upper Tyrolean Lech valley in 2002 (Prodinger et al., 2002). In the described areas, an accumulation of cases of the 'Allgäu' and 'Lechtal' subtypes could be narrowed down to the Bavarian valleys Stillachalp and Rappelalp (S.-R. valley) and the Lech valley on the Austrian side (Fig. 3). However, the 'Karwendel' subtype occurs only in the geographical distinct counties Garmisch-Partenkirchen (GP), Bad Tölz (TÖL), Miesbach (MB) and Schwaz (SW; Fig. 3). Therefore, so far the Karwendel Mountains in the affected counties are identified as the only region where the 'Karwendel' subtype occurs.

## Discussion

Members of the MTC share 99.95% nucleotide identity (Garnier et al., 2003) and are therefore assigned to the group of monomorphic pathogens that contain little sequence diversities between strains (Achtman, 2008). Currently, all bTB cases in the German and Austrian Alpine regions are caused by three genetic subtypes of *M. caprae*, which can be characterized by specific deletions in the RD4 region (Schoepf et al., 2012; Domogalla et al., 2013; Müller et al., 2014). As little is known about the transmission routes of *M. caprae* in particular, a large number of *M. caprae* field isolates ( $n = 241$  including cattle, red deer and one fox) were analysed to gain knowledge about the epidemiology of *M. caprae*. For simultaneous and straightforward differentiation of the three RD4 subtypes 'Allgäu', 'Lechtal' and 'Karwendel', a quick and consistent multiplex PCR protocol of high specificity and sensitivity was developed based on a protocol published previously (Domogalla et al., 2013). Compared to the previously described protocol, the multiplex PCR protocol offers a less laborious and faster subtype identification method as all reactions can be run in one tube. All *M. caprae* isolates investigated so far could clearly be assigned to one of the three RD4 subtypes. Attempts for using the multiplex RD4 PCR protocol for direct detection and subtyping of *M. caprae* DNA from tissue material were not successful (data not shown). As generally known for PCR-based MTC genome detection, key problems with tissue samples are small bacterial loads, an inhomogeneous distribution of the bacteria in the sample material (Parra et al., 2008) and the lack of sensitivity of conventional PCR protocols. To be independent of time-consuming bacterial cultivation, further development of rapid pre-PCR bacterial enrichment or selective bacterial DNA targeting in the sample have to be designed. In addition, a multiplex real-time RD4 PCR protocol for direct targeting of DNA in affected tissues might improve the sensitivity.

RD4 subtyping of isolates collected between 1999 and 2008 already pointed to a spatial co-existence of the two subtypes 'Lechtal' and 'Allgäu'. As the 'Allgäu' subtype preserved its complete RD4 sequence after recultivation, we hypothesize that the genetic variations developed within the hosts rather than being a result of repeated bacterial cultivation. The two DNA samples from isolates originating from Spain (Table 2) also contain a complete RD4 sequence. It remains a subject for further investigation whether deletions affecting the RD4 region also occur in geographical regions other than the Alps.

Subtyping resulted in identical clusters for the subset of *M. caprae* isolates that were tested with the three typing methods MIRU-VNTR genotyping, spoligotyping and RD4 subtyping. Genotyping methods such as MIRU-VNTR enable accurate discrimination of mycobacterial strains as different loci throughout the genome are detected. They are commonly used for molecular epidemiology studies (Mazars et al., 2001; Hauer et al., 2015), but they are also culture dependent, laborious and costly (Mazars et al., 2001; Prodinger et al., 2005). Compared to these genotyping methods, the developed multiplex PCR protocol can easily be applied offering a robust, specific and sensitive subtyping of *M. caprae* isolates. The former differentiation model of *M. bovis* from *M. caprae* based on RD4 detection is misleading when the complete deletion of the *M. caprae* RD4 in the subtype 'Lechtal' is considered (Brosch et al., 2002; Domogalla et al., 2013). The occurrence of few RD4-negative *M. caprae* has also been reported from Spain (Rodríguez-Campos et al., 2014). Therefore, RD4 subtyping is a quick first step for simultaneous identification of *M. caprae* plus subtype determination when molecular epidemiology data are needed and *M. caprae* identity has to be confirmed from culture isolates.

It was recently shown that wild cervids in the United States are infected with various *M. bovis* strains which they acquired from cattle and now amplify transmission of those strains among themselves and cattle (Tsao et al., 2014). In our study, we could show that *M. caprae* subtypes occur spatially distributed in defined geographical regions in the Alpine mountains and are shared by cattle and red deer in these areas.

The distinct occurrence of the 'Allgäu' subtype in cattle in the Tyrolean Ziller Valley (District of Schwaz (SW), Fig. 3) could be traced back to cattle trade and therefore needs not be seen as evidence of an endemic focus. In contrast, the Karwendel subtype is exclusively found in the Karwendel Mountains (Garmisch-Partenkirchen (GAP), Bad Tölz (TÖL) and Achen valley, Fig. 3). However, it remains to be determined how the Karwendel subtype evolved in red deer in this region.

In Austria, a prevalence estimate of up to 23% *M. caprae*-infected red deer was observed in the upper Lech



A. Rettinger et al.

*M. caprae* RD4 Subtyping and Epidemiology

valley region (Schoepf et al., 2012). As described for the Tyrolean Lech valley (Fink et al., 2015), the accumulation of *M. caprae*-infected red deer also exists in smaller geographical locations such as the Stillachalp and Rappenalp valleys (S.-R. valley) in Upper Allgäu (OA) and the Silbertal and Klostertal valleys in Vorarlberg and in the upper river Isar valley in the Karwendel Mountains (Fig. 3). The accumulation of *M. caprae*-infected red might be caused by management strategies leading to an aggregation around winter feeding sites and seasonal high population densities (Schöning et al., 2013; Fink et al., 2015).

It is well known that wildlife can serve as reservoir hosts for bTB (Walter et al., 2014; Fink et al., 2015). For *M. bovis*, the genomic variability is regarded as a patho-adaptive process allowing mycobacteria to adapt to new host species (Mostowy et al., 2005). A limited number of Bavarian Alpine wildlife including badgers (*Meles meles*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), foxes (*Vulpes vulpes*) and alpine marmots (*Marmota marmota*) that were screened for bTB in this study did not show evidence that another wildlife reservoir exists so far. For a definite exclusion of possible further wildlife habitats in the alpine region, a larger number of wildlife animals should be investigated for a long time.

Spillover from one species to another as shown in one fox (Table 3, Fig. 3) in this study did not show additional genetic variation concerning the RD4 sequence. As this was the only *M. caprae*-infected fox we found, we assume that this species is not a maintenance host and the infection was acquired most likely due to carcass consumption. We therefore assume that 'within-host replication' in cattle or red deer led to the described RD4 deletions.

As effective TB control strategies in wildlife are complicated (Bielby et al., 2014), it is difficult to determine the routes of pathogen transmission from one species to another and even within a host population. *M. caprae* transmission is thought to occur most likely on Alpine summer pastures due to a rather indirect than direct contact between red deer and cattle (Fink et al., 2015). The only transmission of *M. caprae* with documented direction from a cattle herd to red deer has been described by Chiari et al. (2014) in Valcamonica (Italy). The large number of field isolates examined in our study and the fact that we did not observe RD4 subtype host specificity indicate that transmission of the three subtypes can occur between cattle and red deer in both directions, as the RD4 subtypes remain genetically stable in both species. So far, it is hard to speculate in which direction transmission might have preferentially occurred in the past. Data from whole-genome sequencing and SNP analyses might resolve genetic evolution of *M. caprae* subtypes and transmission pathways in more detail.

## Acknowledgements

The authors would like to thank all colleagues from the pathology of the Bavarian Health and Food Safety Authority for macroscopically pre-screening of cattle, red deer and wildlife carcasses and organ samples, Walter Glawischnig for pathomorphological inspection of the Austrian samples, Christine Seeber and Josef Kössler for providing the Austrian isolates, Erwin Hofer for collecting and selecting the Austrian isolates, Barbara Pohl for bacteriological cultivation of the Austrian samples, Michael Schwarz for drawing the Austrian map, which was used as template for Fig. 3, and Julia Boenchendorf for the German part of the map and the final layout of Fig. 3. We are grateful to Alicia Aranaz for providing *M. caprae* DNA from two Spanish cattle and to Ludmilla Naumann/Nikolaus Ackermann for maintenance of the LGL mycobacteria culture collection. Thanks to Andreas Moss from the Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety for providing two recent *M. bovis* isolates. We thank all hunters and veterinarians who organized and provided samples, especially Johannes Fritz and Josef Kössler from Veterinary Administration of Tyrol, the Bavarian Hunting Association and Kai Bomans from Upper Allgäu. We are grateful for funding of red deer monitoring by the European Union EMIDA-EraNet ERA-Net project 'Tuberculosis in Alpine Wildlife' in Bavaria and Austria, the Bavarian State Ministry of Environment and Consumer protection, the Austrian Ministry of Health and the Provincial Government of Tyrol for funding the Austrian Karwendel Monitoring.

## Conflict of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

## References

- Achtman, M., 2008: Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 53–70.
- Aranaz, A., E. Liebana, E. Gomez-Mampaso, J. C. Galan, D. Cousins, A. Ortega, J. Blazquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suarez, and L. Dominguez, 1999: *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 3, 1263–1273.
- Aranaz, A., D. Cousins, A. Mateos, and L. Dominguez, 2003: Elevation of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1785–1789.
- Bielby, J., C. A. Donnelly, L. C. Pope, T. Burke, and R. Woodroffe, 2014: Badger responses to small-scale culling may compromise targeted control of bovine tuberculosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 9193–9198.

- Boritsch, E. C., P. Supply, N. Honore, T. Seeman, T. P. Stinear, and R. Brosch, 2014: A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Mol. Microbiol.* 93, 835–852.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole, 2002: A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 3684–3689.
- Byrne, A. W., P. W. White, G. McGrath, J. O’Keeffe, and S. Martin, 2014: Risk of tuberculosis cattle herd breakdowns in Ireland: effects of badger culling effort, density and historic large-scale interventions. *Vet. Res.*, 45, 109.
- Chiari, M., M. Zanoni, L. G. Alborali, G. Zanardi, D. Avisani, S. Tagliabue, A. Gaffuri, M. L. Pacciarini, and M. B. Boniotti, 2014: Isolation of *Mycobacterium caprae* (Lechtal genotype) from red deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *J. Wildl. Dis.* 50, 330–333.
- Domogalla, J., W. M. Prodinger, H. Blum, S. Krebs, S. Gellert, M. Muller, E. Neuendorf, F. Sedlmaier, and M. Buttner, 2013: Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1381–1388.
- Federal Research Institute for Animal Health, January, 2014: Official Collection of Methods for the Sampling and Investigation of Materials of Animal Origin for Notifiable Animal Diseases. Method Collection, 438–458.
- Fink, M., C. Schleicher, M. Gonano, W. M. Prodinger, M. Pacciarini, W. Glawischmig, M. P. Ryser-Degiorgis, C. Walzer, G. L. Stalder, D. Lombardo, H. Schobesberger, P. Winter, and M. Buttner, 2015: Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 464–467.
- Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, and R. G. Hewinson, 2003: The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 7877–7882.
- Gormley, E., L. A. Corner, E. Costello, and S. Rodriguez-Campos, 2014: Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Res. Vet. Sci.* 97(Suppl), S30–S43.
- Hardstaff, J. L., G. Marion, M. R. Hutchings, and P. C. White, 2013: Evaluating the tuberculosis hazard posed to cattle from wildlife across Europe. *Res. Vet. Sci.* 97(Suppl), S86–S93.
- Hauer, A., K. De Cruz, T. Cochard, S. Godreuil, C. Karoui, S. Henault, T. Bulach, A. L. Banuls, F. Biet, and M. L. Boschioli, 2015: Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One* 10, e0117103.
- Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden, 1997: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907–914.
- Mazars, E., S. Lesjean, A. L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, and P. Supply, 2001: High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 1901–1906.
- Mostowy, S., J. Inwald, S. Gordon, C. Martin, R. Warren, K. Kremer, D. Cousins, and M. A. Behr, 2005: Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J. Bacteriol.* 187, 6386–6395.
- Müller, M., A. Hafner-Marx, J. Ehrlein, T. Ewringmann, U. Ebert, B. K. Weber, W. Breuer, A. Kupca, A. Rettinger, P. Zimmermann, J. Domogalla, C. Janko, M. Büttner, K. Deischl, and M. Schick, 2014: Pathomorphological findings in tuberculosis positive red deer due to *Mycobacterium caprae* infection. *Amtstierärztlicher Dienst* 21, 251–258.
- Naranjo, V., C. Gortazar, J. Vicente, and J. de la Fuente, 2008: Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 127, 1–9.
- Parra, A., N. Garcia, A. Garcia, A. Lacombe, F. Moreno, F. Freire, J. Moran, and J. Hermoso de Mendoza, 2008: Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 127, 315–324.
- Prodinger, W. M., A. Eigentler, F. Allerberger, M. Schönbauer, and W. Glawischmig, 2002: Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* spp. *caprae* in western Austria. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2270–2272.
- Prodinger, W. M., A. Brandstatter, L. Naumann, M. Pacciarini, T. Kubica, M. L. Boschioli, A. Aranaz, G. Nagy, Z. Cvetic, M. Ocepek, A. Skrypnyk, W. Erler, S. Niemann, I. Pavlik, and I. Moser, 2005: Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4984–4992.
- Prodinger, W. M., A. Indra, O. K. Koksalan, Z. Kilicaslan, and E. Richter, 2014: *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 1501–1513.
- RindTbV 2008, current status, 2014: Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit, Familie und Jugend zur Verhinderung der Einschleppung und Verbreitung der Tuberkulose der Rinder (Rindertuberkuloseverordnung), 279/2014.
- RindTbV 2013, current status, 2014: Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung), 388.
- Rodriguez, S., J. Bezoz, B. Romero, L. de Juan, J. Alvarez, E. Castellanos, N. Moya, F. Lozano, M. T. Javed, J. L. Saez-Llorente, E. Liebana, A. Mateos, L. Dominguez, and A. Aranaz, 2011: *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 532–535.
- Rodriguez-Campos, S., N. H. Smith, M. B. Boniotti, and A. Aranaz, 2014: Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97(Suppl), S5–S19.

A. Rettinger et al.

*M. caprae* RD4 Subtyping and Epidemiology

- Schoepf, K., W. M. Prodinger, W. Glawischnig, E. Hofer, S. Revilla-Fernandez, J. Hofrichter, J. Fritz, J. Kofer, and F. Schmoll, 2012: A Two-Years' survey on the prevalence of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in red deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet. Sci.* 2012, 245138.
- Schöning, J. M., N. Cerny, S. Prohaska, M. M. Wittenbrink, N. H. Smith, G. Bloemberg, M. Pewsner, I. Schiller, F. C. Oraggi, and M. P. Ryser-Degiorgis, 2013: Surveillance of bovine tuberculosis and risk estimation of a future reservoir formation in wildlife in Switzerland and Liechtenstein. *PLoS One* 8, e54253.
- Smith, N. H., and P. Upton, 2012: Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org. *Infect. Genet. Evol.* 12, 873–876.
- Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen, 2006: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4498–4510.
- Tsao, K., S. Robbe-Austerman, R. S. Miller, K. Portacci, D. A. Grear, and C. Webb, 2014: Sources of bovine tuberculosis in the United States. *Infect. Genet. Evol.*, 28c, 137–143.
- Walter, W. D., R. Smith, M. Vanderklok, and K. C. VerCauteren, 2014: Linking bovine tuberculosis on cattle farms to white-tailed deer and environmental variables using Bayesian hierarchical analysis. *PLoS One* 9, e90925.
- World organisation for animal health (OIE), 2012: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, *Bovine tuberculosis*. Terrestrial Manual, 7th Edition. OIE, France.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Results from genotyping (RD4 typing, MIRU-VNTR and spoligotyping) of 40 Austrian *Mycobacterium caprae* isolates from cattle or red deer.



## 2 Publikation 2

Broeckl, S. et al.

Investigation of intra-herd spread of *Mycobacterium caprae* in cattle by generation and use of a whole-genome sequence

veröffentlicht in *Veterinary Research Communications* (2017)

### Zusammenfassung:

Die genomweite Analyse einzelner Nukleotidpolymorphismen (SNPs) als Diversitätsmarker ist ideal geeignet, um evolutionäre Beziehungen von Krankheitserregern und deren Epidemiologie zu untersuchen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden immer wieder *Mycobacterium-caprae*-Infektionen bei Rindern und Rotwild im bayerischen und österreichischen Alpenraum gemeldet. Derzeit gibt es kaum Informationen über mögliche Übertragungswege von *M. caprae* in Rinderbetrieben und die Diversität der Genomanpassung von *M. caprae* während einer bTB-Infektion. Ziel dieser Publikation war es, detailliertere Informationen über die molekulare Epidemiologie der Rindertuberkulose (bTB) in ausgewählten Rinderbetrieben zu gewinnen und anhand von spezifischen SNP-Unterschieden in den Gesamtgenomsequenzen von *M.-caprae*-Isolaten ein phylogenetisches Netzwerk zu erstellen. Insgesamt wurden 61 Genomsequenzen von *M.-caprae*-Isolaten aus acht bTB-betroffenen Rinderbetrieben über einen Zeitraum von zwölf Jahren, zwischen 2004 und 2015, ausgewertet. Die Auswertung der Sequenzdaten zeigte, dass die *M.-caprae*-Isolate aus einem Betrieb genetische Abstände von wenigen SNPs aufwiesen, hingegen wiesen die *M.-caprae*-Genome aus den Isolaten verschiedener Betriebe deutlich mehr SNP-Unterschiede zueinander auf. Die innerbetriebliche Interaktion der Tiere kann als der dominante bTB-infektionsverursachende Faktor in den Rinderbetrieben angesehen werden. Zudem konnte mit Hilfe der WGS-Analyse eine *M.-caprae*-Infektion aufgrund der räumlichen und zeitlichen Sömmerung auf alpinen Weiden nachgewiesen werden. Des Weiteren wird erstmalig die Gesamtgenom-Sequenz von *M. caprae* veröffentlicht, die aus Genomen von Rindertuberkulosefällen aus dem bayerischen Alpenraum stammt.

*Investigation of intra-herd spread of  
Mycobacterium caprae in cattle by  
generation and use of a whole-genome  
sequence*

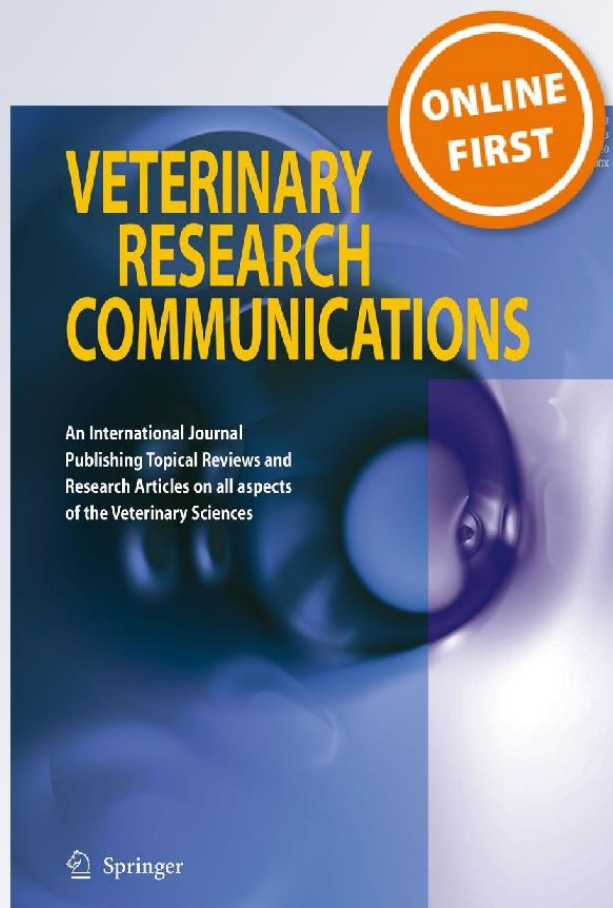
**S. Broeckl, S. Krebs, A. Varadharajan,  
R. K. Straubinger, H. Blum &  
M. Buettner**

**Veterinary Research Communications**

An International Journal Publishing  
Topical Reviews and Research Articles  
on all Aspects of the Veterinary Sciences

ISSN 0165-7380

Vet Res Commun  
DOI 10.1007/s11259-017-9679-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media Dordrecht. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".



## ORIGINAL ARTICLE

## Investigation of intra-herd spread of *Mycobacterium caprae* in cattle by generation and use of a whole-genome sequence

S. Broeckl<sup>1</sup> · S. Krebs<sup>2</sup> · A. Varadharajan<sup>2</sup> · R. K. Straubinger<sup>3</sup> · H. Blum<sup>2</sup> · M. Buettner<sup>1</sup>Received: 16 August 2016 / Accepted: 29 January 2017  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2017

**Abstract** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) calculated from whole genome sequencing (WGS) are ideally suited to study evolutionary relationships of pathogens and their epidemiology. *Mycobacterium caprae* infections have been documented frequently in cattle and red deer along the Bavarian and Austrian Alps during the last decade. However, little is still known about the transmission within cattle holdings and possible alterations of the genomes of *M. caprae* during such events. The aim of this study was to study the molecular epidemiology of bovine tuberculosis (bTB) in selected herds based on isolate-specific genome-wide SNPs and to perform a phylogenetic network analysis. In total, 61 *M. caprae* isolates were collected originating from eight cattle farms over a period of twelve years between 2004 and 2015. Analysis of their sequence data revealed that the *M. caprae* isolates of an affected farm differ at all in a few SNPs. In contrast, many more SNPs were found when comparing the *M. caprae* genomes originating from different herds. The results demonstrated that the spread of bTB in the affected farms occurred

by direct transmission between the members of each herd rather than between herds and a *M. caprae* introduction in farms after contact events e. g. on summer pastures can readily be traced by WGS analysis. Furthermore, we assembled a nearly complete whole genome sequence of *M. caprae* derived from several cattle isolates originating from bTB cases in the Bavarian Alpine region.

**Keywords** *Mycobacterium caprae* · Bovine tuberculosis (bTB) · Whole genome sequencing (WGS) · Molecular epidemiology · Single nucleotide polymorphism (SNP) · Cattle

### Introduction

Tuberculosis is still a major threat for humans and animals worldwide, predominately in underdeveloped countries. Although dominated by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), all members of the so called *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), namely *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* and *M. mungii*, are obligate zoonotic pathogens. *M. caprae* has been classified as a unique species within MTC not so long ago based on its genomic peculiarities (Aranaz et al. 2003). In addition, a number of facultative pathogenic mycobacteria such as *M. abscessus*, *M. ulcerans* or *M. fortuitum* can cause severe disease in immunocompromised individuals (Henkle and Winthrop 2015; Jarzembowski and Young 2008; Tortoli 2009). Whereas *M. tuberculosis* is the most important pathogen for humans, *M. bovis* and *M. caprae* predominantly affect ruminants. Zoonotic transmission of *M. bovis* from livestock to humans has been effectively reduced in Europe since World War II by the pasteurization of milk and consistent eradication

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11259-017-9679-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. Buettner  
buemat5@web.de

<sup>1</sup> Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinaerstr. 2, 85764 Oberschleissheim, Germany

<sup>2</sup> Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, Ludwig-Maximilians-University (LMU) Munich, Feodor-Lynen-Str. 25, 81377 Munich, Germany

<sup>3</sup> Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University (LMU) Munich, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany



programs. Due to the detection of tuberculosis in less than 0.1% of cattle farms per year, Germany has been officially declared free of bTB (OTF) since 1996 (Decision 97/76/EC) (European Commission 1996). Nowadays, infections of humans with *M. bovis* or *M. caprae* are rare events in industrial countries, but still have substantial impact on developing countries, e. g. in Africa (Prodinger et al. 2014). Although the combat against livestock tuberculosis was very successful in the northern hemisphere, the infection is far from being completely eradicated. Possible re-emergence is a permanent threat showing geographical disparity in Germany as bTB is caused by *M. bovis* in the north and by *M. caprae* along the Austrian and Bavarian Alps in the southwest (Eisenberg et al. 2015). The latter is closely linked to a recently defined wildlife reservoir in alpine red deer (Fink et al. 2015). Other wildlife reservoirs are well known for *M. bovis* in the northeastern counties of Lower Michigan in free-ranging white-tailed deer, in badgers in U. K. and in the bush possum in New Zealand (Rhyan and Spraker 2010). Thus, due to limited success in controlling the disease (for historical, social and economic reasons) in wildlife reservoirs and maintenance hosts, tuberculosis can spillback to cattle herds and continues to be present in livestock (O'Brien et al. 2006). Transmission of *M. caprae* between cattle and red deer revealed to be a common event at alpine summer pastures causing a slight increase of bTB in Tyrolean and southwest Bavarian (region of Allgäu) cattle herds since 2009 (Fink et al. 2015; Schoepf et al. 2012). Interestingly, recurrent infections of bTB can be observed in farms even after the culling of all animals and establishing new herds (Conlan et al. 2012). In Europe diagnostic detection of *M. caprae* infections is based on in vivo immune responses such as the allergic delayed type hypersensitivity (DTH) skin reaction and post mortem by the presence of granuloma (tubercle) at meat inspection. However, since there is no gold standard diagnostic test available, several animals can become affected in a single herd without obvious clinical signs and remain unrecognized due to doubtful or negative results in the single intra-dermal comparative cervical tuberculin (SICCT) test. In addition, all commercial diagnostic tests are based on *M. bovis* reagents. Thus, non-reactivity in SICCT is likely to be a time-from-infection dependent event also called the *occult period* (Fischer et al. 2005). In post mortem tuberculosis diagnosis whole genome sequencing (WGS) became established recently, providing useful insights into the biology of pathogens at the highest level of discrimination (DePristo et al. 2011). Whole genome sequencing paves the way to compare *M. caprae* genomes with highest possible resolution. In contrast to commonly used approaches like spoligotyping (Groenen et al. 1993; Hermans et al. 1991; Kamerbeek et al. 1997) or MIRU based analysis (Magdalena et al. 1998; Prodinger et al. 2005; Supply et al. 2001), SNPs allow distinguishing isolates to trace infection routes or to characterize and distinguish closely related strains (Bryant et al.

2013b). The complete genome sequence of the laboratory strain, *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al. 1998) has long been used as representative reference for many comparative genome analyses (Periwal et al. 2015), due to a lack of whole genome data of various *Mycobacterium* spp. species (Abecasis et al. 2010). The availability of a correctly assembled genome sequence of *M. caprae* as a specific and high-quality reference genome is essential for improved WGS analysis facing large collections of field isolates. Only recently, a draft genome based on non-scaffolded contigs from a Spanish field isolate of *M. caprae* has been published (de La Fuente et al. 2015). However, repetitive regions (pe and pgrs genes) containing a diversity of proline-glutamate (PE) and proline-proline-glutamate (PPE) gene families are often problematic for WGS due to technical limitations of reading length. Members of these gene families with their high guanine and cytosine content impair sequencing and genome assembly (Bryant et al. 2013a; Copin et al. 2014; Stucki et al. 2015). Anyhow, we established a fully assembled whole genome sequence of *M. caprae* derived from several cattle isolates originating from bTB cases in the Bavarian Alpine region. Using this genome-wide approach for accurate isolate characterization and comparison of individual isolate transmission within herds were investigated.

## Materials and methods

### Collection of *M. caprae* isolates from cattle in affected farms

Infections with *M. caprae* or *M. bovis* in cattle are considered as notifiable animal disease in Germany. Therefore, sample collection was performed according to specific national legislation. The focus of this study was on eight cattle farms in different geographical regions of the Bavarian Alps where bTB had been reported to be once introduced and continued to spread within the herds. The analyzed bTB cases occurred over a time period of twelve years between 2004 and 2015. In total, 61 *M. caprae* isolates from bTB affected cattle farms were used for whole genome sequencing (WGS) and detection and analysis of single nucleotide polymorphism (SNP). Anonymized records of farm location, cattle age, sex, cattle movements and date of movement into the clustered herds (last holding) were requested from the "HI-Tier" electronic reporting system ([www1.hi-tier.de](http://www1.hi-tier.de)), a database containing individual details of all cattle in Germany. The data base is administered by the Bavarian State Ministry of Food, Agriculture and Forestry (StMELF). Further, the results from cattle which had undergone single intradermal comparative cervical tuberculin (SICCT) testing (de La Rua-Domenech et al. 2006) were reported from the district veterinary offices of Upper and Lower Allgäu. The standard screening tests for



bTB were performed by veterinary officers of the regional administrative authorities (OIE - World Organisation for Animal Health 2012). The difference in skin-fold thickness was measured in millimeters (mm) before and 72 h after the intradermal injections of *M. avium* (control) and *M. bovis* purified protein derivatives (PPDs) following the prescribed executive regulations. Results of the post-mortem examination in pathology were provided and entered into the laboratory information management system (LIMS) of the Bavarian Health & Food Safety Authority (LGL). All data and details for tuberculous lesions, clinical details from infected animals and results of subsequent confirmatory tests are shown in the Supplementary Table S1. All test procedures were performed in accordance with institutional guidelines prescribed in the collection of methods of the National Reference Laboratory (NRL) Friedrich-Loeffler Institut (FLI) in accordance with German legislation. The life history of all 61 cattle was compiled comprising birth and death dates. In addition, genome deletion based RD4 subtyping as described by Domogalla et al. (2013) was performed with *M. caprae* isolates from all 61 animals.

#### External contact cattle

##### *Selection of two possible external contact animals*

Due to the paucity of information about cattle contact and possible infection/transmission from outside the selected herds the analysis of bTB scenario is limited to intra-herd events. Only in one occasion (herd 5) two *M. caprae* infected cattle from other herds were included additionally into the sample collection and treated as two possible external contact animals to herd 5 due to alpine pasture reports. These two external contact cattle (C1/5.04 and C2/5.06) had spent the summer season on alpine pastures and were known to be kept together with two cattle (5.04 and 5.06) from study herd 5 during summering on an alpine pasture in 2006 and 2007.

#### Mycobacterial cultivation

Specimens for mycobacterial cultivation included organ tissue with visible lesions, pathologically suspicious tissue material and inconspicuous lymphoid tissue from animals showing doubtful SICCT results. All cultivation attempts were performed in a biosafety level three (BSL3) laboratory. For mycobacterial cultivation from tissue, appropriate pre-treatment and processing like homogenization, decontamination and concentration was performed as follows: two to three grams of tissue (lymph nodes) were homogenized in 5 ml NaCl solution (0.9%) using the IKA Ultra Turaxx® Tube Drive System (IKA®, Staufen, Germany). The suspension was decontaminated with 1-% N-acetyl-L-cystein solution in a total volume of 20 ml and neutralized after incubation for 25 min at room temperature with 20 ml phosphate buffer

(pH 6.8) as recommended in the NRL-FLI “method collection” (Federal Research Institute for Animal Health 2016). After incubation for 25 min on a shaker, the solution was centrifuged for 20 min at 3300 x g. The supernatant was discarded. To obtain a uniform bacterial distribution, the sediment was suspended in 0.5 ml phosphate buffer (pH 6.8) and inoculation of mycobacterial growth media was done with 200 µl of the suspension. Mycobacterial culture was performed on two solid media at 37 °C: (a) Stonebrink medium including polymyxin B, amphotericin B, carbenicillin und trimethoprim (PACT) and (b) Lowenstein-Jensen medium with glycerin and PACT (heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Germany). Additionally, mycobacteria were grown in liquid media Middlebrook 7H9 broth base supplemented with 800 µl MGIT growth supplement (BBL MGIT PANTA, Becton Dickson, Heidelberg, Germany) containing polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim and azlocillin using the BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Becton Dickson, Heidelberg, Germany). Media were screened for bacterial growth at regular (weekly) intervals.

#### Species differentiation

Within the MTC group species identification was performed using the commercial test kit GenoType® MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany).

#### Growth and sub-cultivation of *Mycobacteria*-positive cultures

For whole genome sequencing a high quality and sufficient quantity of bacterial genomic DNA are necessary requiring the isolation of contamination-free mycobacterial colonies. Therefore, two in-vitro passages (subculture) of each liquid stock culture (obtained from infected tissue) were performed in liquid media Middlebrook 7H9 broth base and MGIT growth supplement using the BACTEC system at 37 °C for six to eight weeks each. The second BACTEC subculture was performed in duplicate and these were used for DNA extraction.

#### Isolation of bacterial genomic DNA

Genomic mycobacterial DNA was extracted using the Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The modified DNA extraction method was carried out as follows: from each BACTEC subculture (second BACTEC subculture) suspended liquid media were carefully discarded with a disposable pipette and from two culture tubes aliquots of 0.5 ml (in total 1.0 ml) of the cell sediment were transferred to a 1.5-ml micro-centrifuge tube. After adding 500 µl of 1 x TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid and 1 mM EDTA, pH 8.0) centrifugation for 6 min at 15,000 x g was performed to pellet the cells. The supernatant was carefully



discarded by pipetting or pouring. Cells were solubilized by repeated taking up and down dispensing with 600 µl of cell suspension solution. Thereafter, 3 µl of lytic enzyme solution were added and the suspension was mixed by inverting the tube 25 times. An incubation step for a minimum of 30 min at 37 °C followed. Cells were sedimented for 6 min at 15,000 x g and the supernatant was carefully discarded by pipetting or pouring. Cells were lysed after suspension in 450 µl of cell lysis solution and 15 µl proteinase K overnight at 57 °C with gentle shaking followed by an incubation step on ice for 1 min. Subsequently, 160 µl protein precipitation solution were added and vortexed vigorously for 20 s at high speed (2500 rpm) before incubation on ice for a minimum of 1 h. The solution was centrifuged for 6 min at 15,000 x g. The supernatant was transferred to a sterile 1.5-ml microcentrifuge tube containing 600 µl isopropanol and 1.2 µl glycogen and mixing was done by gently inverting the tube 50 times. Precipitated DNA was sedimented as a small white pellet by centrifugation at 15,000 x g for 15 min. The supernatant was carefully discarded and the sediment was washed with 700 µl of 70-% ethanol (v/v) by inverting the tube several times for DNA precipitation. DNA was sedimented by centrifuging the tube at 14,000 x g for 10 min and the supernatant was carefully removed. Residual EtOH was removed by air drying the pellet for 5–10 min at room temperature while taking care not to over-dry the DNA pellet. The DNA was dissolved in 50 µl DNA hydration solution under gentle shaking at 65 °C for 1 h and incubated at 95 °C for 10 min to prevent carry-over of residual mycobacteria according to the laboratory safety standards of the Bavarian Health and Food Safety Authority. After having left the biosafety area, samples were transferred to new tubes and stored at 4 °C.

#### DNA quality and quantity assessment

To assess the quality of the extracted DNA a Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) was used measuring single absorbance peaks at 260 nm and 260/280 absorbance ratios of 1.8–2.0.

#### Multiplex PCR protocol for RD4 subtyping

The multiplex PCR for RD4 subtyping of *M. caprae* isolates was performed as previously described (Rettinger et al. 2015). All reactions were run in a single reaction tubes using a T3000 thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). Reactions were carried out in a total volumes of 50 µl. PCR contained 1.25 U of HotStarTaq® DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), reaction buffer, Q solution, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.3 µM each primer, 1 µl template DNA and RNase-free water to 50 µl. Cycling parameters were as follows: one pre-denaturation step for 15 min at 95 °C; followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min;

and a final elongation step for 10 min at 72 °C. PCR products were separated in a 1.5-% agarose gels (1 x TAE) at 100 V for 1 h and visualized under UV light using ethidium bromide for DNA staining.

#### Whole genome sequencing and assembly

In order to generate a reference genome for *M. caprae* standard paired-end and mate-pair libraries (Nextera mate-pair sample preparation Kit, Illumina, San Diego, USA; gel-free protocol) were generated according to the manufacturer's instructions. Mate-pair libraries for assembly were sequenced on a Miseq (Illumina, San Diego USA) in 250-bp paired end mode. Paired-end libraries used for assembly were sequenced on HiSeq1500 in 125-bp paired mode. Mate-pair reads containing no circularization adaptors were filtered out and the remaining ones were preprocessed by removing the adaptor sequences and by creating the reverse complements of the reads. Individual libraries were first assembled into contigs by using the assembly programs Velvet, SGA and SPADES. Contigs were manually joined and scaffolded guided by alignment to the *M. tuberculosis* genome sequence of the strain H37Rv (GenBank accession No. CP003248). The draft versions were visually inspected by aligning the paired end and mate-pair libraries with bowtie confirming the correct joining of contigs. The draft was improved by running multiple iterations of the Post Assembly Genome Improvement Toolkit (PAGIT) pipeline (Swain et al. 2012). Finally, the assembly was broken at potentially mis-assembled sites using the program REAPR. Remaining gaps were closed with sequencing results derived from gap-spanning PCR products. Unique PCR primers flanking each gap were designed with Primer3 (Koressaar and Remm 2007; Untergasser et al. 2012) and purchased from Primer-Management (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). PCR was carried out with the HotStarTaq DNA Polymerase kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described by the manufacturer with product-dependent variations of the cycling parameter and the amount of enzyme. PCR amplifications were performed in a T3000 thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). PCR-amplified DNA fragments were separated by electrophoresis in 0.8 to 2-% agarose gels and visualized under UV after ethidium bromide staining. DNA fragments were prepared for sequencing by the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and sequenced with Sanger Sequencing to create gap-spanning long reads. The Sanger sequence was then aligned against the draft genome and the gap-spanning sequence was inserted. The final draft version of *M. caprae* (GenBank accession number: CP016401) contains a single gap, which could not be closed by any of the approaches mentioned. Furthermore, the final assembled draft genome sequence of *M. caprae* was compared with the contig-based



complete genome sequence of the Spanish field isolate recently published by de La Fuente et al. (2015). The contigs of the Spanish genome were sorted using CISA (Contig Integrator for Sequence Assembly) (Lin et al. 2013) and concatenated using the final assembled draft version of *M. caprae* from this study as a reference. The software RATT (Rapid Annotation Transfer Tool) (Otto et al. 2011) was used to transfer the genome annotation from the *M. tuberculosis* H37Rv, as a high-quality reference genome to the new unannotated draft genomes of *M. caprae*. Beyond that, an alternative annotation of the *M. caprae* genomes was carried out with Prokka (Seemann 2014). INDIGO was used to construct complex queries and combine annotations from multiple sources starting from genomic sequence to protein domain (Alam et al. 2013). For an automated and systematic comparison of mycobacterial annotations of particular genomes the software tool BEACON was used deriving extended annotation based on GenBank formats as an input (Kalkatawi et al. 2015). The DNA sequence genome browser and annotation tool called Artemis that allows the results to be viewed in the context of the sequence and its six-frame translation (Carver et al. 2012; Rutherford et al. 2000) was used for visualization of the gen annotation.

#### Library generation and variant calling

Sequencing libraries from 61 *M. caprae* isolates were prepared from 100 ng of DNA sonicated with a Bioruptor (NextGen, Diagenode, Liege, Belgium) using the single-stranded next generation sequencing (NGS) Library Preparation Kit (Swift Bioscience, Ann Arbor, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing was done on a HiSeq1500 (Illumina, San Diego, USA) in paired-end mode with a read length of 100 bp in each direction. SNPs were called from each strain by an automated pipeline constructed with open source tools. First fastq files were pre-processed by removing the first 15 nucleotides from the beginning of read2 (recommended by manufacturer of library prep kit to remove potentially non-templated bases introduced by the preparation protocol), trimming bases with a PHRED score (Ewing et al. 1998; Ewing and Green 1998) lower than 20 from both ends of all reads and filtering for a minimal length of 50 bp after all trimming steps. Remaining reads were mapped by BWA mem against the *M. caprae* reference genome and results with a mapping quality below 30 were excluded. Duplicate reads were removed with the Picard tool and indels were realigned by the GATK suite. Finally, variants were called by VARSCAN and accepted if the locus was covered at least 50 times and the frequency of the variant allele was at least 90%. Tables of SNPs differing between members of the same herd were extracted and confirmed or corrected by visual inspection in the IGV. Resulting SNP tables are shown

in the supplementary information (Table S2 and S3). The final data sets were used to generate Median-Joining Networks (MJ networks) using the software Network5 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) beginning with minimum spanning trees and combining within a single reticulate network using the MJ method (Bandelt et al. 1999). All sequence data generated for this study have been deposited at the European Archive and are available under the accession number: PRJEB14479 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB14479>)

#### Modeling of transmission chains and phylogenetic analysis

##### Median-joining networks

The SNP data and the anonymized life history data containing isolates of each herd were used to determine the bTB transmission phylogeny at an intra-herd and inter-individual scale. The phylogenetic analysis based on SNP data were undertaken by using Network 4.613. In principle phylogenetic trees were constructed in four steps. First, a SNP character state data set was generated and all nucleotide characters were treated as ordered. Next, the genetic distances between each data set were applied and the weight to each character was considered as default weight of ten. Thereafter, the network was calculated with the MJ algorithm (Bandelt et al. 1999) and the parameter epsilon was set to ten as recommended. Epsilon specifies a weighted genetic distance to the known sequences in the data set, within which potential median vectors may be constructed to connect the nodes. A median vector is a hypothetical sequence which is required to connect existing sequences within the network with maximum parsimony. The final step is to draw the network with a frequency value of one. This means that one SNP-sequence entry corresponds uniquely to one taxon. Due to limitation of the software in the number of SNPs as input, two separate networks were constructed for the two RD4 types "Allgäu" and "Lechtal".

##### Maximum-likelihood phylogenetic tree

A maximum-likelihood phylogenetic tree was constructed in order to check consistency with the unrooted MJ network analysis. Genome-wide sequence variations (SNPs) with respect to the *M. caprae* reference genome were extracted for all *M. caprae* isolates including an outgroup and stored as multiple sequence alignment in a FASTA file. An approximately maximum-likelihood phylogenetic tree was generated using a generalized-time-reversible model of nucleotide evolution implemented in the FastTree tool (Price et al. 2010). The tree was rooted with an outgroup isolate originating from a bTB infected cattle belonging to *M. caprae* representing the RD4 type "Karwendel" (Domogalla et al. 2013).



## Results

### Bacterial species identification

All mycobacterial culture isolates were identified to belong to the *M. caprae* species as indicated by the GenoType® MTBC test.

### RD4 subtyping by multiplex PCR

Purified genomic DNA from 61 selected *M. caprae* isolates was used to carry out the RD4 deletion-based typing. The *M. caprae* isolates were derived from eight herds and two additional isolates originating from contact cattle. A multiplex PCR and a specific primer set was used for typing of *M. caprae* isolates and assigning them to one of three RD4 subtypes previously identified and designated “Allgäu”, “Lechtal” and “Karwendel” (Domogalla et al. 2013; Rettinger et al. 2015). All isolates were found to belong to either the “Allgäu” or the “Lechtal” type. The RD4 type “Allgäu” was identified in herd 3, herd 4, herd 5, herd 8 and the two external contact cattle. *M. caprae* isolates from herd 1, herd 2, herd 6 and herd 7 were assigned to the RD4 type “Lechtal”. The results of RD4 typing of the 61 *M. caprae* isolates originating from cattle encompassing the years 2004 to 2014 are shown in Table 1.

### Geographical origin of the eight study herds

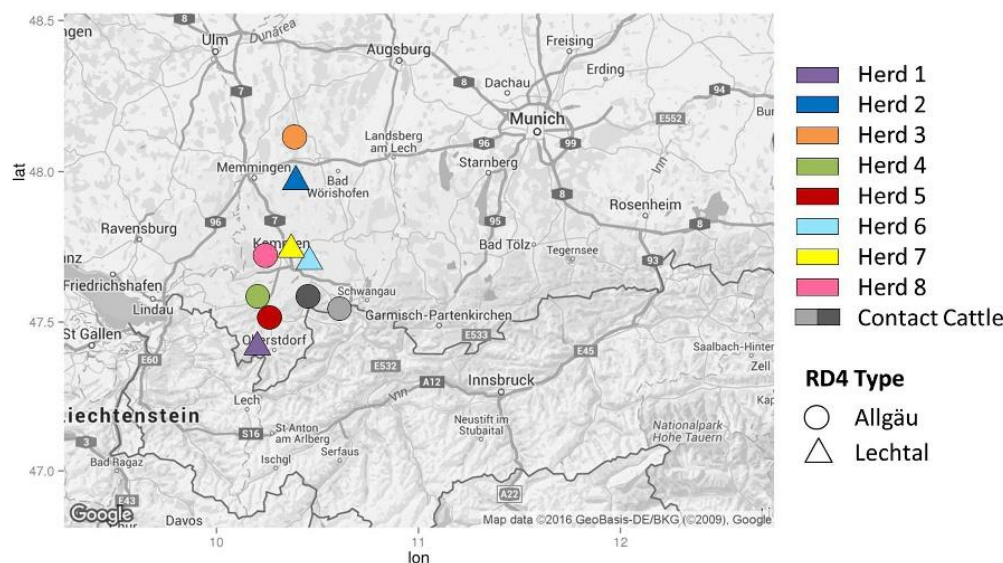
All 61 analyzed *M. caprae* mycobacteria were isolated within the counties Upper and Lower Allgäu. An approximate geographical location of the eight herds and the two possible external contact cattle are marked by different colors in Fig. 1. The identified RD4 types “Allgäu” or “Lechtal” are indicated by two different shapes (circle, triangle) for each herd.

### Cattle life history

A life history for all *M. caprae* infected cattle from the eight affected herds was constructed by evaluating the exact date of birth, the day of death and the day of joining the study herd (e. g. by trade), if the particular animal was not born in the holding. It spans a time frame from 1992 to 2016 (Fig. 2). The overlap in cattle life histories potentially allowed studying the course of cattle-to-cattle transmission based on the acquired SNPs of *M. caprae* isolates. The available data from in vivo and post mortem bTB diagnostics were utilized to define critical time points in the cattle infection process: i) exposed (“E”), denoting an animal as potentially infected, but without confirmation by any diagnostic test and without indication of bTB transmission to other individuals; ii) potentially tested positive (“T”), meaning the in vivo test gave an ambiguous result but the animal was

**Table 1** Selected *Mycobacterium caprae* isolates and types attributed to area localization of farms (OA and UA)<sup>1</sup>

Herd	Isolate identification number	Year of origin	District (Allgäu)	RD4 type
Herd 1	1.01	2004	OA	Lechtal
	1.02	2004	OA	Lechtal
	1.03	2004	OA	Lechtal
	1.04	2004	OA	Lechtal
	1.05	2004	OA	Lechtal
Herd 2	2.01	2004	UA	Lechtal
	2.02	2004	UA	Lechtal
	2.03	2004	UA	Lechtal
	2.04	2004	UA	Lechtal
	2.05	2004	UA	Lechtal
Herd 3	3.01	2008	UA	Allgäu
	3.02	2008	UA	Allgäu
	3.03	2008	UA	Allgäu
	3.04	2008	UA	Allgäu
Herd 4	4.01	2009	OA	Allgäu
	4.02	2009	OA	Allgäu
	4.03	2009	OA	Allgäu
	4.04	2009	OA	Allgäu
	4.05	2009	OA	Allgäu
	4.06	2009	OA	Allgäu
	4.07	2009	OA	Allgäu
	4.08	2009	OA	Allgäu
	4.09	2009	OA	Allgäu
	4.10	2009	OA	Allgäu
Herd 5	5.01	2013	OA	Allgäu
	5.02	2013	OA	Allgäu
	5.03	2013	OA	Allgäu
	5.04	2013	OA	Allgäu
	5.05	2013	OA	Allgäu
	5.06	2013	OA	Allgäu
	5.07	2013	OA	Allgäu
	5.08	2013	OA	Allgäu
	5.09	2013	OA	Allgäu
	5.10	2013	OA	Allgäu
Herd 6	6.01	2013	OA	Lechtal
	6.02	2013	OA	Lechtal
	6.03	2013	OA	Lechtal
	6.04	2013	OA	Lechtal
	6.05	2014	OA	Lechtal
Herd 7	7.01	2014	OA	Lechtal
	7.02	2014	OA	Lechtal
	7.03	2014	OA	Lechtal
	7.04	2014	OA	Lechtal
	7.05	2014	OA	Lechtal
	7.06	2014	OA	Lechtal
	7.07	2014	OA	Lechtal
	7.08	2014	OA	Lechtal
Herd 8	8.01	2014	OA	Allgäu
	8.02	2014	OA	Allgäu
	8.03	2014	OA	Allgäu
	8.04	2014	OA	Allgäu
	8.05	2014	OA	Allgäu
	8.06	2014	OA	Allgäu
	8.07	2014	OA	Allgäu
	8.08	2014	OA	Allgäu
	8.09	2014	OA	Allgäu
	8.10	2014	OA	Allgäu
	8.11	2014	OA	Allgäu
Contact	C1/5.04	2008	OA	Allgäu
Cattle	C2/5.06	2013	OA	Allgäu



**Fig. 1** Geographical allocation of *M. caprae* affected cattle farms in the dataset. The herds 1 to 8 are marked by colors. The farm location of possible external contact cattle due to alpine pasture summering are

indicated in grey. The location signs the last holding site of each herd. The two different shapes represent the RD4 type attribution of the *M. caprae* isolates according to Table 1

likely not to shed mycobacteria, and finally iii) infectious ("I") with a high probability to shed mycobacteria (Barlow et al. 1997) (see Supplementary Table S1). The data and classification plus the life history were used to determine genomic *M. caprae* clusters found in each herd.

#### Assembly of a *M. caprae* reference genome

Whole genome sequencing was used to generate a nearly complete *M. caprae* reference genome of the "Allgäu" type. DNA fragments obtained by sequencing of standard libraries or mate-pair libraries in paired-end mode ( $2 \times 250$  b) were first assembled to a draft reference genome. It was stepwise improved by applying various software packages and remaining gaps were closed by sequencing of gap-spanning PCR products. The final draft version of this *M. caprae* genome is 4.3 Mbp in size comprising one scaffold of two contigs joined by a single gap of unknown size, localized at genome position from 3,897,639 to 3,897,939 bp, which could not be closed by any of the applied approaches. The genome was annotated by transferring the annotation of the *M. tuberculosis* H37Rv genome to the newly assembled *M. caprae* draft genome.

#### Comparison of the de novo assembled *M. caprae* reference genome and the contig-based Spanish genome

During the course of our study, a contig-based *M. caprae* genome from a Spanish goat isolate was published (de La Fuente et al. 2015). This non-scaffolded draft was compared to our

final scaffolded draft. Therefore, the contigs from de La Fuente et al. (2015) were aligned to the finally assembled *M. caprae* genome draft version from this study, sorted and concatenated. Mapping a WGS library to the ordered contigs from de La Fuente et al. (2015) and our draft genome showed nearly identical total number of mapped reads, but a higher fraction of properly mapped read pairs in our draft (99.4%) than in the draft from de La Fuente et al. (2015) (98.5%). Together with the fact that our draft has a slightly higher number of nucleotides (4.32 Mbp vs 4.23 Mbp) the draft presented here can be considered more complete and correctly scaffolded. The comparison further revealed that the Spanish field isolate contains the complete RD4 region and therefore it would be assigned to the RD4 type "Allgäu". Furthermore, the sequence analysis of our *M. caprae* draft genome revealed a deletion designated "RD4 near" in close location to the type-specific presence of the complete RD4 region in type "Allgäu". This deletion spans 9.2 kb in size located downstream the RD4 region reaching from genome position 1,779,278 to 1,788,506 bp in relation to the *M. tuberculosis* H37Rv genome. Interestingly, this "RD4 near" deletion was found in all our sequenced *M. caprae* genomes independent from their RD4 type and the distance to the RD4 region was identical. However, the Spanish goat isolate is lacking this deletion nearby the RD4 region in contrast to our *M. caprae* draft genome.

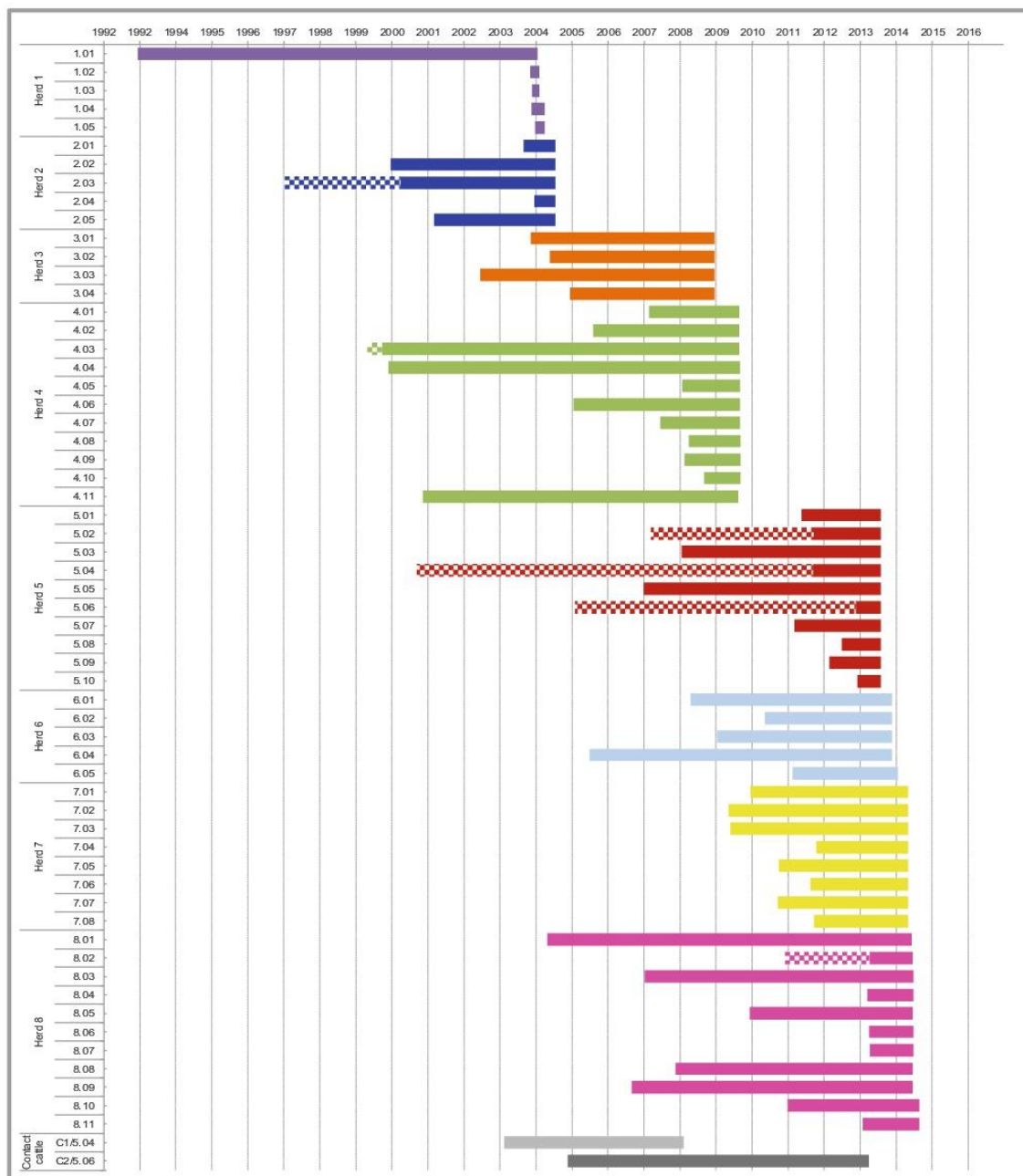
#### SNP detection

Highly fragmented DNA resulting from heat treatment according to safety regulations was successfully used to



Author's personal copy

Vet Res Commun



**Fig. 2** Animal life history of all cattle from which SNP genome analysis of *M. caprae* isolates was performed. Life history of all individuals residing within the eight study herds in the time frame between 1992 and 2016 (x axis) is depicted. The colored bars mark the individuals in

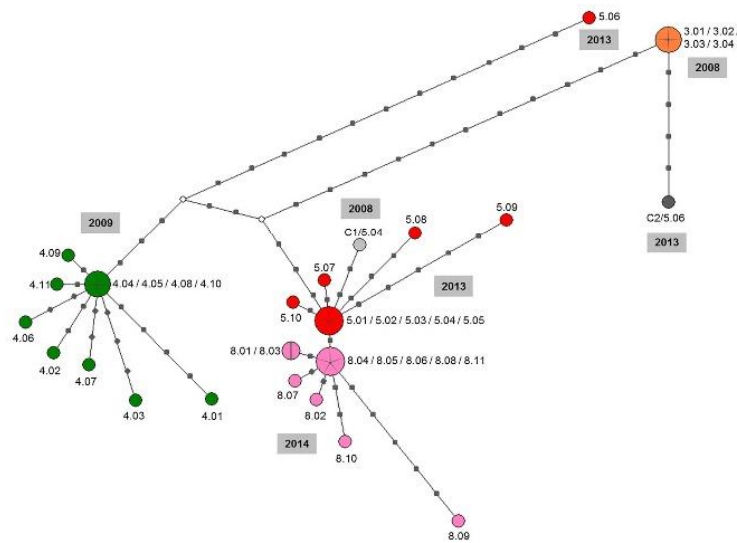
the holdings and correspond to the colors chosen in Table 1 and Table S1. Each bar represents a single animal. The transparent part in the bars represents the time before entering the study herd. The lifespan of the two external contact animals on pasture is marked in grey

construct 61 whole genome covering libraries as a basis for the identification of isolate specific SNPs. Whole genome sequencing from all 61 *M. caprae* isolates was performed

and the genome-wide SNP calling was done in relation to the *M. caprae* reference genome. SNP tables showing the differences between individual animals were created

Author's personal copy

Vet Res Commun



**Fig. 3** Phylogenetic network based on SNP data of *M. caprae* genomes with intact RD4 representing the type “Allgäu”. Herd 3 is colored in orange, herd 4 in green, herd 5 in red, herd 8 in pink and the possible external contact cattle to herd 5 due to alpine pasture summering are marked in gray (see Table 1). The length of each branch and the number of square symbols “■” represent the genetic distance (mutational events) separating sequences. Every black square symbol

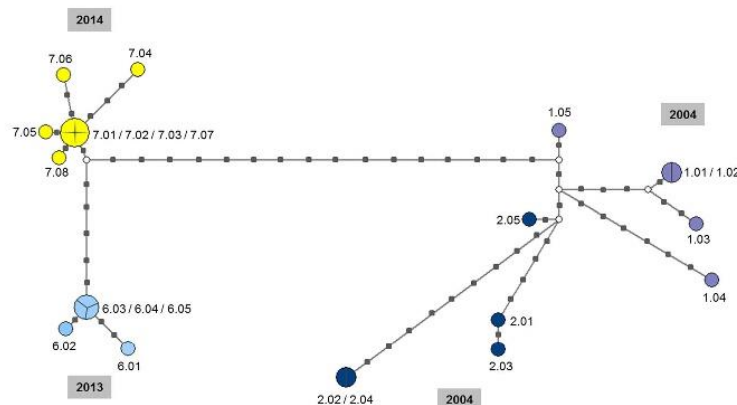
“■” corresponds to a single nucleotide polymorphism (SNP). The size of the circle is proportional to the number of isolates sharing the same SNP - profile and these are marked side by side. In this Median-Joining Network potential median vectors (hypothetical genotype) are displayed as white circles “○” to connect the genome sequences. The years for bTB outbreak specifications also indicate the sampling time

separately for the RD4 type “Allgäu” and “Lechtal” (Fig. 3 and Fig. 4), because both types differ in several hundred SNPs. We found a number of 72 SNPs in all analyzed isolates of the “Allgäu” type and a number of 62 SNPs within all analyzed members of the “Lechtal” type. All examined SNP calls used for further analysis are shown in the Supplementary Information (Table S2 and Table S3).

### Phylogenetic network

#### *M. caprae* type “Allgäu”

SNP-based phylogenetic networks were created for the visualization of the genetic relationship of isolates and to estimate the probabilities of transmission of *M. caprae* within and



**Fig. 4** Phylogenetic network based on SNP data of *M. caprae* genomes representing the RD4 type “Lechtal”. Herd 1 is colored in purple, herd 2 in dark blue, herd 6 in light blue and herd 7 in yellow (see Table 1). The length of each branch and the number of square symbols “■” represent the genetic distance (mutational events) separating sequences. Every black square symbol “■” corresponds to a single nucleotide

polymorphism. The size of the circle is proportional to the number of isolates sharing the same SNP - sequences and these are marked side by side. In this Median-Joining Network potential median vectors (hypothetical genotype) are displayed as white circles “○” to connect the genome sequences. The year specifications indicate the sampling dates

between the herds or during summer pasture. The median joining network based on SNP data of the *M. caprae* genomes with RD4 type "Allgäu" (herd 3, herd 4, herd 5, herd 8 and both external contact cattle) showed that the isolates derived from a dedicated herd differ in up to five SNPs (Fig. 3). A higher number of SNPs was found comparing *M. caprae* strains of the same RD4 type isolated from different herds. These cases strongly support the spread of *M. caprae* by direct cattle-to-cattle transmission.

All isolates derived from infected animals from herd 3 were genetically identical without any SNPs. Within herd 4, the isolates obtained from animals 4.04, 4.05, 4.08 and 4.10 are genetically identical and are displayed as a central node. The diagnostic status of the hosts was indicated as infectious "I", except for the host of isolate 4.04 that had to be marked as exposed "E". This animal was older than all other infected animals. When compared to the members of this central node, two isolates originating from cattle 4.09 and 4.11 differed only in one single SNP and further three isolates from cattle 4.02, 4.06 and 4.07 by two SNPs. Two additional isolates have three (cattle 4.03) and four (cattle 4.01) SNPs. The Supplementary Table S1 contains the attributed infection status (exposed "E" and infectious "I") of each host and all available diagnostic data. Seventy-five percent of the selected cattle from herd 3 and herd 4 were tested positive in the SICCT skin test (no SICCT test data could be linked to isolates 4.05, 4.07 and 4.10 from herd 4).

Based on their SNPs the *M. caprae* isolated from herd 5 and herd 8 were arranged in a star-like structure (Fig. 3). In total, five isolates (cattle 5.01, 5.02, 5.03, 5.04 and 5.05) were assigned to the central node of herd 5. Their genomes were found to be identical and their hosts have been diagnosed as exposed "E", positive "T" or infective "I". The two *M. caprae* isolates 5.07 and 5.10 differ in one SNP only. Three and five SNPs were identified in the isolates 5.08 and 5.09. Their hosts were given the diagnostic status infective "I". This phylogenetic relationship of *M. caprae* isolates indicates that animals in herd 5 are likely to be infected by a single event followed by spread of the pathogen within the herd. In herd 5, the largest observed genetic distance to the members of the central node was sixteen SNPs and was found in isolate 5.06. The infection status of its host was defined as exposed "E". The host of isolate 5.06 was kept on an alpine pasture in 2006 and 2007 (Supplementary Table S1) and might have been infected during that time. Up to now, no close relative of isolate 5.06 was found but indirect contact on pasture to infected red deer cannot be excluded.

A similar situation as in herd 5 was found in herd 8. Five isolates have identical genomes and were assigned to the central node (Fig. 3: cattle isolates 8.04, 8.05, 8.06, 8.08 and 8.11). The diagnostic status of their hosts was positive "T" and infective "I" (see Supplementary Table S1). The genetic distance of four additional *M. caprae* isolates from the herd

(animals 8.01, 8.02, 8.03, and 8.07) was one SNP only, whereof the genomes of isolates 8.01 and 8.03 were identical. However, the *M. caprae* isolates 8.10 and 8.09 differed in two respectively five SNPs to the members of the central node. Interestingly, the *M. caprae* genomes of the defined central nodes in herd 5 and herd 8 differ in one SNP only. Surprisingly, no animal was found that could explain a direct transfer of the pathogen between herd 5 and herd 8 despite the strikingly close genetic relationship of one SNP only in the central node of both herds. The genetic distance of at least sixteen SNPs between the isolates obtained from herd 3 in 2008 and herd 4 in 2009 does not support a single source of infection for these herds.

#### *M. caprae* type "Lechtal"

The phylogenetic network analysis based on SNP data from *M. caprae* isolates of the RD4 type "Lechtal" (herd 1, herd 2, herd 6 and herd 7) resulted in a star shape structure with a central node for herd 6 and herd 7. In contrast, isolates derived from herd 1 and herd 2 were not assignable to a central node (Fig. 4).

In herd 1 solely the genomes of cattle isolates 1.01 and 1.02 were identical and the remaining three differ between five and eleven SNPs, respectively. The majority of their hosts had a relatively short lifetime of 71 days (1.03), 96 days (1.05) and 133 days (1.04), respectively. Only the host of isolate 1.01 was eleven years old at the date of diagnosis. All hosts of herd 1 had been classified to be in an infective state of potentially positive "T" and infective "I". None of the analyzed *M. caprae* isolates had an SNP pattern that can be positioned as a source of infection of herd 1 or herd 2. Furthermore, the *M. caprae* isolates from herd 1 and herd 2 have a heterogeneous SNP pattern except two genetically identical isolates in each herd (1.01 / 1.02 and 2.02 / 2.04 see Fig. 4).

When the ages of bTB hosts of herd 2 and herd 1 are compared, it is interesting that two of five infected hosts (cattle 2.01 and 2.04) have been younger than one year pointing to a rapid course of infection in these animals. Unfortunately, the diagnostic data for determination of the status of infection of animals within herd 2 were not available. The genomes of isolates 2.01 and 2.03 are genetically closely related and differ in only one SNP. Moreover, the hosts of the genetically identical *M. caprae* isolates 2.02 and 2.04 were four years and six months old, respectively. The host of isolate 2.05 was three years old and this pathogen was genetically closely related to the isolates obtained from herd 1. Unfortunately, no information from the history reports of direct or indirect contact between herd 1 and herd 2 were available and the geographical localization of these two herds was far apart (Fig. 1). However, a temporal movement on alpine pasture in 2004 was reported for animals of herd 1 and a contact to herd 2 animals along with infection cannot be excluded (see Supplementary Table S1).



The constructed central nodes of the SNP-based phylogenetic networks of herd 6 and herd 7 contain four (6.03, 6.04 and 6.05) and three isolates (7.01, 7.02 and 7.03) and have an inter-herd genetic distance of six SNPs. The affected hosts in both herds had been at least two years old and were given the infection status potentially positive “T” and infective “I” (see Supplementary Table S1). In both herds isolates have been found that differ in one (6.02, 7.05 and 7.08), two (6.01 and 7.06) or three (7.04) SNPs from the members forming the central node within the herd. Their hosts also were classified either as potentially positive “T” or infective “I”. The holdings of herd 6 and herd 7 were localized geographically close to each other and an alpine pasture summering was reported for both herds. Though, no direct or indirect contact could be derived from the history reports of these two herds.

Within the phylogenetic network of the *M. caprae* isolates of the RD4 type “Lechtal”, the isolates collected in herd 1 and herd 2 during the early bTB outbreaks in 2004 differ in at least sixteen SNPs from those found in 2013 in herd 6 and from those found in 2014 in herd 7 (Fig. 4). The isolates obtained in herd 1 and herd 2 differed maximally in four SNPs (1.05 versus 2.05) and therefore were genetically more closely related than those from herd 6 and herd 7.

Considering the *M. caprae* genomes of isolates of the later bTB outbreak - 2013 (herd 6) and 2014 (herd 7) – the inter-herd genetic distance of the *M. caprae* isolates assigned to the central nodes of herd 6 and herd 7 is six SNPs. The intra-herd isolate SNP variation is rather low (maximum three SNPs in herd 7) indicating a close genetic relationship of the isolates within each herd.

#### Maximum-likelihood phylogenetic tree

High resolution clustering was performed with a FASTA file containing the multiple sequence alignment of the 4783 SNPs which are identified by mapping the whole genome sequence data of all isolates to the *M. caprae* reference genome. A SNP was considered in the alignment if it was present at least in a single sample. Identified SNPs were subjected to phylogenetic analysis using the approximately-maximum-likelihood and generalized time-reversible model of evolution. The obtained phylogenetic tree was then rooted by selecting a *M. caprae* isolate assigned to the RD4 type “Karwendel” as the outgroup O.1 (see Supplementary Fig. S4). The same colour-marking as shown for *M. caprae* isolates from herds 1 to 8 was obtained in accordance with Table 1 and Fig. 1. The resultant maximum-likelihood tree clustered the isolates into uniformly colored lineages. Lineages of *M. caprae* isolates with RD4 type “Allgäu” from herd 3, herd 4, herd 5, herd 8, the two possible contact animals C1/5.04 and C2/5.06 and the lineages of *M. caprae* isolates with RD4 type “Lechtal” from herd 1, herd 2 and herd 6 evolve from a separate branch in relation to the outgroup O.1 (genotype “Karwendel”). Each sub-

lineage is represented by a uniform color reflecting the isolates from the same herd. Colored clades were separated from each other and they did not mix with the exception of some isolates from herd 5 (5.02, 5.03, 5.07 and 5.10). This may either be caused by a low genome coverage resulting in miscalled SNPs or by low genome-wide sequence variations between isolates of herd 5 and herd 8. Further, isolate 5.06 appeared like in the MJ network (compare Fig. 3) with a large genetic distance to the other members of herd 5 and an infection of its host (isolate 5.06) with an external bacterial population has to be assumed. Cattle isolate 6.02 belonging to herd 6 appeared to be more distant with respect to its neighbours but it was most likely due to miscalled SNPs caused by highly variable sequencing coverage of this particular strain. This did not affect the network analysis to the same extent, because it uses only the few SNPs that differ between the animals of the same sub-lineage. The maximum-likelihood phylogenetic tree showed a very similar outcome than the unrooted cluster MJ phylogenetic tree.

#### External contact cattle

**Position of external contact cattle** In search of possible transmission routes, herd records for alpine pasturing were analyzed from the collection of confirmed bTB cases (data not shown) and two *M. caprae* infected cattle were selected (C1/5.04 and C2/5.06) due to a possible direct contact of their companion hosts during alpine pasture. As evidenced by evaluation of the data of alpine pasture summering, these two cattle have been on the same summer pasture in 2006 and 2007 as reported for two cattle from herd 5 (animals 5.04 and 5.06). The animal C1/5.04 was found to be on the same alpine pasture with animal 5.04 and animal C2/5.06 was identified as a possible external contact to animal 5.06 due to alpine summering in 2006 and 2007 (data about alpine pasture are shown in the Supplementary Table S1).

The *M. caprae* isolates from the external contact cattle C1/5.04 and animal 5.04 are closely related based on the SNP data (Fig. 3). However, for the *M. caprae* genomes of contact cattle C2/5.06 and 5.06 a close genetic relationship was not found and an infection by a direct contact cannot be assumed. The *M. caprae* genome isolated from host C1/5.04 differed in only two SNPs from the isolates assigned to the central node of herd 5. If the transfer of the pathogen occurred during summer pasturing, it had to take place latest in summer 2007, seven years before the infection of herd 5 has been detected. Thus, the isolate genome C1/5.04 originating from the pasture-contact animal is closely related to the herd 5 bTB scenario or vice versa. In contrast, the genomes of the *M. caprae* isolates from animals C2/5.06 and 5.06 differ in 28 SNPs and therefore a direct transmission of the pathogen between these two hosts reported to be kept together during summer pasture is unlikely. On the other hand, the *M. caprae* genome isolated



from the potential contact animal C2/5.06 differs in only four SNPs from the isolates derived from herd 3 found in the 2008 outbreak. Thus, based on SNP similarity this points to a bTB exchange with animals from herd 3 rather than with herd 5 although it is not distinctively reported.

**Position of the two external contact cattle within the maximum-likelihood phylogenetic tree** The obtained maximum-likelihood phylogenetic tree rooted with a *M. caprae* type “Karwendel” isolate genome as the outgroup O.1 (see Supplementary Fig. S4) showed a strict separation between the lineages of type “Allgäu” and type “Lechtal”. The *M. caprae* isolates from the supposed external contact cattle C1/5.04 and animal 5.04 belonging to the lineages of type “Allgäu” show a close genetic relationship similar as in the unrooted Median-Joining Network with type “Allgäu” (Fig. 3). Thus, an infection by a direct contact can be assumed. As in the MJ network a large distance was found between the genomes of *M. caprae* isolates from animals C2/5.06 and 5.06 excluding the possibility of a direct infection. In contrast to the initial assumption animal C2/5.06 is quite close to herd 3 and a bTB exchange with animals from herd 3 may be considered.

## Discussion

In the present work WGS was used to study *M. caprae* genomes isolated from selected cattle holdings in the Bavarian Alps. A *M. caprae* genome is regarded to be superior for SNP based comparative analysis of *M. caprae* genomes than any other species genome belonging to the MTC complex. Therefore, the first fully assembled quality draft genome sequence of *M. caprae* was established in this study. A minor limitation of this approach is that it contains a single gap of unknown size due to a repetitive region containing a diversity of proline-glutamate (PE) and proline-proline-glutamate (PPE) gene families which impair sequencing and genome assembly (Bryant et al. 2013a; Copin et al. 2014; Stucki et al. 2015). We used our assembled *M. caprae* genome as a reference for analysis of WGS data and the identification of SNPs. It has to be mentioned, that in order to create a valid basis for SNP analyses, the same number of subcultures of each isolate was grown under identical conditions (James et al. 2000) and used to prepare genomic DNA. The rareness of backward mutations in mycobacteria and homoplasy (Comas et al. 2013; Namouchi et al. 2012) allows for each distinct isolate to follow the transmission chain according to the pattern of acquired SNPs (Pérez-Lago et al. 2014). However, there is increasing evidence that mycobacterial populations in humans are heterogeneous as a consequence of ongoing microevolution (Pérez-Lago et al. 2014; Stucki et al. 2015). This might impair the detection of direct host to host transmission events especially if the

period between infection of the host and the isolation of the pathogen is unknown.

Here, the study has focused on within-herd transmission and SNPs in 59 *M. caprae* genomes isolated from eight study herds and two additional isolates from external contact cattle were analyzed under consideration of the limited available results of veterinary examinations. In addition, little information was available about cattle movements and any other inter-farm contacts. Therefore, it has to be kept in mind that the assumption of single transmissions as an explanation for the persistence of bTB on farms may be insufficient. Multiple bTB entries such as re-introduction of the same lineage from neighboring herds, environmental mycobacteria persistence, external population or other hosts have to be considered. Several factors are accountable for bTB circulation within herds, but the source of infection initially driving the dynamics of bTB spread within herds must be separated into i) sources that are external and contribute to first and re-introduction, and ii) sources that are anchored within the herd (Goodchild and Clifton-Hadley 2001). The use of WGS offers the opportunity to study both the introduction and spread of bTB (Biek et al. 2012). In general, the *M. caprae* genomes obtained from dedicated herds differ at all in a few SNPs. That finding hints to a central source of infection in a herd/holding and to an ongoing but slow evolution as evidenced by the low number of SNPs. Furthermore, in many cases it hints to a short period between infection and manifestation and toward the evolution of *M. caprae* strains that might rapidly propagate. This situation is found as well in the “Lechtal” strains isolated from herd 6 and herd 7 as in the “Allgäu” strains obtained from herd 4, herd 5 and herd 8. In all these herds the phylogenetic network analysis revealed a central node formed by genetically identical strains and a number of additional isolates with up to six individual SNPs (Fig. 3 and Fig. 4).

Results of the obtained maximum-likelihood phylogenetic tree (Supplementary Fig. S4) are in good agreement with the unrooted MJ network. The phylogenetic tree constructed from the sequenced *M. caprae* genomes clustered the isolates into two distinct phylogenies representing *M. caprae* type “Allgäu” and type “Lechtal” genotype. Uniform coloration of the sub-lineages in the phylogenetic tree signified the evidence of *M. caprae* transmission within the same herd. Although, the MJ network analysis offered more details about possible transmission histories the outcome of the maximum-likelihood phylogenetic tree revealed almost the same results. Both analytic approaches showed that within each herd a distinct genetic lineage is identifiable and the sub-lineages can clearly be attributed to the same lineage (herd). A single discrepancy (isolate 6.2) may result from miscalled or undetected SNPs due to a low genome coverage. For the phylogenetic tree a visual inspection and manual editing of the SNPs is not practicable due to the presence of several thousands of SNPs throughout the whole genome when compared to the



*M. caprae* reference genome. In contrast, a manual SNP editing was done for the unrooted MJ network analysis because only the few SNPs differing between two joined nodes had to be considered. Nevertheless, the phylogenetic tree analysis is in accordance with the unrooted cluster MJ network and supports the data with a very similar outcome. Even though, the results of the network analysis generated confidence in identification of cattle-to-cattle transmission rather than an inter-herd transmission. Along with the observed phylogeny, the results have to be interpreted with caution, because of the small size of the dataset and the possible introduction of *M. caprae* from external hosts. Further, unknown time of infection, non-coordinated timing and mode of sampling tissues from infected hosts are sub-optimal conditions to capture the genetic variability of the pathogen caused by microevolution in older animals during longer incubation periods. However, when the number of SNPs found in *M. caprae* genomes obtained from different herds is compared a much higher difference is found. Furthermore, it must be taken in account that i) a defined low level of polymorphism is known for *M. tuberculosis* genomes (Hershberg et al. 2008), ii) laboratory isolates may become orders of magnitude more mutable than wild type strains (Hall 2006) and iii) the maximum SNP difference for confirmation of a link between isolates is not yet established (Guerra-Assunção et al. 2015; Pérez-Lago et al. 2014). The inter-herd SNP comparison can be useful when data about a relationship linked to trade or other direct or indirect contact between farms point to bTB spread. The structure of the phylogenetic network revealed that the infection of each herd started with a single event followed by a transmission to several members instead of a linear stepwise case-to-case transmission. The presence of a possible “super-spreader” (Gardy et al. 2011; Stein 2011) within most of the analyzed herds (e. g. cattle isolates 4.04, 5.04, 6.04 and 8.08) is likely (Fig. 3 and Fig. 4). The existence of so called “super-spreaders” is more realistic than previously assumed (Pérez-Lago et al. 2014; Walker et al. 2013) and the fact that a “star-like pattern” of transmission in one outbreak scenario will rapidly cause more than one secondary case further implies that stock clearance after the detection of bTB infected cattle is not unfounded. The rapid spread of *M. caprae* infections within holding points to effective transmission possibly via se- and excretion and cannot be limited to aerosols and droplet infection by coughing and generalized tuberculosis. In very young animals alimentary infection by contaminated milk feeding has also to be considered (Humblet et al. 2009). Clinical signs and generalized manifestation of *M. caprae* infection were rarely seen among the cases in the Alpine region since 1999. Brooks-Pollock et al. (2014) highlighted the multifactorial nature of transmission routes and range of spatial scales involved in the dynamics of bTB caused by *M. bovis* in Great Britain. Along with the aim of eradication they concluded that whole herd culling or vaccination will result in the best impact

on all routes of transmission and control of the spread of bTB (Brooks-Pollock et al. 2014). Further, it has to be kept in mind that where more than one skin-test-positive cattle (reactor) is discovered in a herd, the source of infection of other animals in close proximity is most likely located in the herd (Goodchild and Clifton-Hadley 2001). The application of analytical methods like the phylogenetic network analysis is a good tool for inferring putative missing nodes to reveal the connections between the cattle isolates (Pérez-Lago et al. 2014; Woolley et al. 2008). It can reflect putative undiagnosed members of the *M. caprae* transmission chain. Those undetected infections might form the missing central node in herd 1 and herd 2 (Fig. 4). The high number of SNPs indicates that each of both herds was infected by a single source and the pathogens spread after a prolonged latency possibly linked to infections acquired at different places, e. g. alpine pastures. Beyond that, the pathogens affecting both herds (herd 1 and herd 2) were genetically closely related and differ in a few SNPs only (Fig. 4). The same close genetic relationship was found in *M. caprae* isolated from herd 5 and herd 8. In both cases it has to be assumed, that those herds were in contact with each other, although the geographical allocation of the last holding site of herd 1 and herd 2 is far apart. It is indisputable that cattle movements associated with animal trade are a major risk for herd-to-herd spread of *M. bovis* e. g. in bTB in Britain (Gilbert et al. 2005; Johnston et al. 2005) or France (Palisson et al. 2016). A spatial and temporal movement of animals for alpine pasture summering can be tracked for cattle isolates 5.04 and C1/5.04 and may be connected to the *M. caprae* transmission within herd 5. Direct or indirect contact (contaminated objects) requires infected and shedding animals to be present in the same epidemiological group (Goodchild and Clifton-Hadley 2001). However, experimental evidence is provided that a bTB transmission can occur indirectly on pasture (Phillips et al. 2003; Schellner 1956). Only recently, the role of contaminated environment was highlighted in Great Britain (King et al. 2015). The presence of bTB on alpine pastures as an external source of infections may contribute to the persistence of *M. caprae* infections in the bovine population especially in regions where summer pasturing is common. The identification of red deer (*Cervus elaphus*) as a wildlife reservoir for *M. caprae* has complicated the situation since the transmission chain between red deer and cattle or vice versa remains to be resolved. In this context it has to be mentioned that cattle isolate 5.06 from herd 5 belonging to a 2013 *M. caprae* outbreak revealed sixteen identified SNPs difference to the central node fixed in herd 5. The animal 5.06 faced a short exposure time on that farm but its isolate genome had an atypical amount of SNPs and an infection from an unknown external source is likely. Timing of infection and transmission should be much more facilitated when direct ex vivo (se-/excretes, e. g. feces, saliva) derived mycobacteria genomes can be tested instead of isolates from



post mortem organ material. The results illustrated that WGS analysis enhanced the toolkits for phylogenetic and epidemiological studies by adding more detailed information; higher resolution and improved discrimination to reveal *M. caprae* isolate peculiarities. Moreover, the fully assembled *M. caprae* genome sequence will provide a useful reference for further molecular and functional studies of MTC species members, especially for discrimination and fine characterization of *M. caprae* and *M. bovis* isolates.

**Acknowledgement** The authors would like to thank all colleagues from the pathology of the Bavarian Health and Food Safety Authority for macroscopically pre-screening of cattle carcasses and organ samples. We are grateful for excellent support by H. Lang and technicians in bacteriology. Special thanks to A. Graf for his support with the Galaxy platform and J. Boenchenndorf for her help extracting the data from the HI-Tier system. We are grateful to J. Magés and K. Bomans from the district veterinary office of Upper Allgäu and F. Götz from East Allgäu for their information. Thanks to N. Ackermann for maintenance of the LGL mycobacteria culture collection. This work was funded by the Bavarian State Ministry of Nutrition, Agriculture and Forestry.

**Compliance with ethical standards** Isolates were obtained as part of the routine activity of the Bavarian Health and Food Safety Authority and were analyzed anonymously.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** The authors declare that ethical approval was not required.

**Informed consent** The authors declare that informed consent was not required.

## References

- Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467(7319):1061–1073. doi:10.1038/nature09534
- Alam I, Antunes A, Kamau AA, Ba alawi W, Kalkatawi M, Stingl U, Bajic VB, Hernandez-Lemus E (2013) INDIGO – Integrated data warehouse of Microbial Genomes with examples from the Red Sea extremophiles. *PLoS One* 8(12):e82210. doi:10.1371/journal.pone.0082210
- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L (2003) Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 6):1785–1789. doi:10.1099/ijs.0.02532-0
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1):37–48
- Barlow ND, Kean JM, Hickling G, Livingstone PG, Robson AB (1997) A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. *Prev Vet Med* 32(1–2):57–75. doi:10.1016/S0167-5877(97)00002-0
- Biek R, O'Hare A, Wright D, Mallon T, McCormick C, Orton RJ, McDowell S, Trewby H, Skuce RA, Kao RR (2012) Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of *Mycobacterium bovis* in sympatric cattle and badger populations. *PLoS Pathog* 8(11):e1003008. doi:10.1371/journal.ppat.1003008
- Brooks-Pollock E, Roberts GO, Keeling MJ (2014) A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. *Nature* 511(7508):228–231. doi:10.1038/nature13529
- Bryant JM, Harris SR, Parkhill J, Dawson R, Diacon AH, van Helden P, Pym A, Mahayiddin AA, Chuchottawom C, Sanne IM, Louw C, Boeree MJ, Hoelscher M, McHugh TD, Bateson ALC, Hunt RD, Mwaigwisya S, Wright L, Gillespie SH, Bentley SD (2013a) Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. *Lancet Respir Med* 1(10):786–792. doi:10.1016/S2213-2600(13)70231-5
- Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, Kremer K, van Hijum SA, Siezen RJ, Borgdorff M, Bentley SD, Parkhill J, van Soolingen D (2013b) Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 13:110. doi:10.1186/1471-2334-13-110
- Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA (2012) Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28(4):464–469. doi:10.1093/bioinformatics/btr703
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Gamier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekai F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393(6685):537–544. doi:10.1038/31159
- Comas I, Coscollá M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S (2013) Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 45(10):1176–1182. doi:10.1038/ng.2744
- Conlan AJK, McKinley TJ, Karolemeas K, Pollock EB, Goodchild AV, Mitchell AP, Birch CPD, Clifton-Hadley RS, Wood JLN (2012) Estimating the hidden burden of bovine tuberculosis in Great Britain. *PLoS Comput Biol* 8(10):e1002730. doi:10.1371/journal.pcbi.1002730
- Copin R, Coscollá M, Seiffert SN, Bothamley G, Sutherland J, Mbayo G, Gagneux S, Ernst JD (2014) Sequence diversity in the *pe\_pgrs* genes of *Mycobacterium tuberculosis* is independent of human T cell recognition. *MBio* 5(1):13. doi:10.1128/mBio.00960-13
- de La Fuente J, Díez-Delgado I, Contreras M, Vicente J, Cabezas-Cruz A, Manrique M, Tobes R, López V, Romero B, Domínguez L, Garrido JM, Juste R, Gortazar C (2015) Complete genome sequences of field isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Genome Announc* 3(3). doi:10.1128/genomeA.00247-15
- de La Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS (2006) Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 81(2):190–210. doi:10.1016/j.rvsc.2005.11.005
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43(5):491–498. doi:10.1038/ng.806



- Domogalla J, Proding WM, Blum H, Krebs S, Gellert S, Müller M, Neuendorf E, Sedlmaier F, Büttner M (2013) Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. J Clin Microbiol 51(5):1381–1388. doi:10.1128/JCM.02966-12
- Eisenberg T, Nesseler A, Sauerwald C, Kling U, Riße K, Kaim U, Althoff G, Fiege N, Schlez K, Hamann H-P, Fawzy A, Moser I, Riße R, Kraft G, Zschöck M, Menge C (2015) *Mycobacterium tuberculosis* exposure of livestock in a German dairy farm: implications for intra vitam diagnosis of bovine tuberculosis in an officially tuberculosis-free country. Epidemiol Infect:1–8. doi:10.1017/S0950268815001995
- European Commission (1996) 97/76/EC: Commission Decision of 17 December 1996 laying down the methods of control for maintaining the officially tuberculosis free status of bovine herds in certain Member States and regions of Member States (Text with EEA relevance). CELEX number: 31997D0076. Official Journal L 019, 22/01/1997:34–36
- Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred II error probabilities. Genome Res 8(3):186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186
- Ewing B, Hillier L, Wendt MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces Using Phred I. Accuracy assessment. Genome Res 8(3):175–185. doi:10.1101/gr.8.3.175
- Federal Research Institute for Animal Health (2016) Official collection of methods for the sampling and investigation of materials of animal origin for notifiable animal diseases (method collection). pp. 1–22. [https://openagrar.bmel-forschung.de/receive/openagrar\\_mods\\_00005698](https://openagrar.bmel-forschung.de/receive/openagrar_mods_00005698)
- Fink M, Schleicher C, Gonano M, Proding WM, Pacciarini M, Glawischnig W, Ryser-Degiorgis M-P, Walzer C, Stalder GL, Lombardo D, Schobesberger H, Winter P, Büttner M (2015) Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, alpine region. Emerg Infect Dis 21(3):464–467. doi:10.3201/eid2103.141119
- Fischer EAJ, van Roermund HJW, Hemerik L, van Asseldonk MAPM, de Jong MCM (2005) Evaluation of surveillance strategies for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) using an individual based epidemiological model. Prev Vet Med 67(4):283–301. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.12.002
- Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJM, Brinkman FSL, Brunham RC, Tang P (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. N Engl J Med 364(8):730–739. doi:10.1056/NEJMoa1003176
- Gilbert M, Mitchell A, Boum D, Mawdsley J, Clifton-Hadley R, Wint W (2005) Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. Nature 435(7041):491–496. doi:10.1038/nature03548
- Goodchild AV, Clifton-Hadley RS (2001) Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis (Edinb) 81(1–2):23–41. doi:10.1054/tube.2000.0256
- Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD (1993) Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol Microbiol 10(5):1057–1065
- Guerra-Assunção JA, Crampin AC, Houben R, Mzembe T, Mallard K, Coll F, Khan P, Banda L, Chiwaya A, Pereira RP, McNemey R, Fine PE, Parkhill J, Clark TG, Glynn JR (2015) Large-scale whole genome sequencing of *M. tuberculosis* provides insights into transmission in a high prevalence area. eLife 4:110. doi: 10.7554/eLife.05166
- Hall LMC (2006) Hypermutable bacteria isolated from humans - a critical analysis. Microbiology 152(9):2505–2514. doi:10.1099/mic.0.29079-0
- Henkle E, Winthrop KL (2015) Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. Clin Chest Med 36(1):91–99. doi:10.1016/j.ccm.2014.11.002
- Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD (1991) Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect Immun 59(8):2695–2705
- Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov DA, Feldman MW, Gagneux S, Blaser MJ (2008) High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. PLoS Biol 6(12):e311. doi:10.1371/journal.pbio.0060311
- Humblot MF, Boschirolu ML, Saegerman C (2009) Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. Vet Res 40(5). doi:10.1051/vetres/2009033
- James BW, Williams A, Marsh PD (2000) The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. J Appl Microbiol 88(4):669–677. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01020.x
- Jarzemowski, Young (2008) Nontuberculous Mycobacterial Infections. Archives of Pathology & Laboratory Medicine (No. 8):1333–1341
- Johnston WT, Gettinby G, Cox DR, Donnelly CA, Boume J, Clifton-Hadley R, Le Fevre AM, McInerney JP, Mitchell A, Morrison WI, Woodroffe R (2005) Herd-level risk factors associated with tuberculosis breakdowns among cattle herds in England before the 2001 foot-and-mouth disease epidemic. Biol Lett 1(1):53–56. doi:10.1098/rsbl.2004.0249
- Kalkatani M, Alam I, Bajic VB (2015) BEACON: automated tool for bacterial GENome annotation ComparisON. BMC Genomics 16(1):493. doi:10.1186/s12864-015-1826-4
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 35(4):907–914
- King HC, Murphy A, James P, Travis E, Porter D, Hung YJ, Sawyer J, Cork J, Delahay RJ, Gaze W, Courtenay O, Wellington EM (2015) The variability and seasonality of the environmental reservoir of *Mycobacterium bovis* shed by wild European badgers. Sci Report 5:12318. doi:10.1038/srep12318
- Koressa T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics 23(10):1289–1291. doi:10.1093/bioinformatics/btm091
- Lin S-H, Liao Y-C, Watson M (2013) CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes. PLoS One 8(3):e60843. doi:10.1371/journal.pone.0060843
- Magdalena J, Supply P, Locht C (1998) Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 36(9):2471–2476
- Namouchi A, Didelot X, Schöck U, Gicquel B, Rocha EPC (2012) After the bottleneck: genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. Genome Res 22(4):721–734. doi:10.1101/gr.129544.111
- O'Brien DJ, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Berry DE, Hickling GJ (2006) Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: the Michigan, USA, experience. Vet Microbiol 112(2–4):313–323. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.014
- OIE - World Organisation for Animal Health (2012) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 7.ed. OIE, Paris
- Otto TD, Dillon GP, Degraeve WS, Berriman M (2011) RATT: rapid annotation transfer tool. Nucleic Acids Res 39(9):e57–e57. doi:10.1093/nar/gkq1268
- Palisson A, Courcoul A, Durand B, Cunha MV (2016) Role of cattle movements in bovine tuberculosis spread in France between 2005 and 2014. PLoS One 11(3):e0152578. doi:10.1371/journal.pone.0152578
- Pérez-Lago L, Comas I, Navarro Y, González-Candelas F, Herranz M, Bouza E, García-de-Viedma D (2014) Whole genome sequencing

- analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis* 209(1):98–108. doi:10.1093/infdis/jit439
- Periwal V, Patowary A, Vellankal SK, Gupta A, Singh M, Mittal A, Jeyapaul S, Chauhan RK, Singh AV, Singh PK, Garg P, Katoh VM, Katoh K, Chauhan DS, Sivasubbu S, Scaria V (2015) Comparative whole-genome analysis of clinical isolates reveals characteristic architecture of *Mycobacterium tuberculosis* pangenome. *PLoS One* 10(4):e0122979. doi:10.1371/journal.pone.0122979
- Phillips C, Foster C, Morris P, Teverson R (2003) The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci* 74(1):1–15. doi:10.1016/S0034-5288(02)00145-5
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5(3):e9490. doi:10.1371/journal.pone.0009490
- Prodinger WM, Brandstatter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirolu ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnyk A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I (2005) Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 43(10):4984–4992. doi:10.1128/JCM.43.10.4984-4992.2005
- Prodinger WM, Indra A, Koksalan OK, Kilicaslan Z, Richter E (2014) *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 12(12):1501–1513. doi:10.1586/14787210.2014.974560
- Rettinger A, Broeckl S, Fink M, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Domogalla J, Just F, Gellert S, Straubinger RK, Büttner M (2015) The region of difference four is a robust genetic marker for subtyping *Mycobacterium caprae* isolates and is linked to spatial distribution of three subtypes. *Transbound Emerg Dis*. doi:10.1111/tbed.12438
- Rhyan JC, Spraker TR (2010) Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Vet Pathol* 47(1):34–39. doi:10.1177/0300985809354466
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream M-A, Barrell B (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16(10):944–945. doi:10.1093/bioinformatics/16.10.944
- Schellner H (1956) Risk of infection in cattle grazing pastures contaminated with tubercle bacilli. *Rindertuberkulose* 5 1956(5):179–188
- Schoepf K, Prodinger WM, Glawischning W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Köfer J, Schmoll F (2012) A two-Years' survey on the prevalence of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in red deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet Sci* 2012(15):1–7. doi:10.5402/2012/245138
- Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14):2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
- Stein RA (2011) Super-spreaders in infectious diseases. *Int J Infect Dis* 15(8):e510–e513. doi:10.1016/j.ijid.2010.06.020
- Stucki D, Ballif M, Bodmer T, Coscolla M, Maurer A-M, Droz S, Butz C, Borrell S, Längle C, Feldmann J, Furrer H, Mordasini C, Helbling P, Rieder HL, Egger M, Gagneux S, Fenner L (2015) Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strain-specific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing. *J Infect Dis* 211(8):1306–1316. doi:10.1093/infdis/jiu601
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Loch C (2001) Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39(10):3563–3571. doi:10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001
- Swain MT, Tsai IJ, Assefa SA, Newbold C, Berriman M, Otto TD (2012) A post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nat Protoc* 7(7):1260–1284. doi:10.1038/nprot.2012.068
- Tortoli E (2009) Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect* 15(10):906–910. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03014.x
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40(15):e115. doi:10.1093/nar/gks596
- Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE (2013) Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 13(2):137–146. doi:10.1016/S1473-3099(12)70277-3
- Woolley SM, Posada D, Crandall KA, Stajich JE (2008) A comparison of phylogenetic network methods using computer simulation. *PLoS One* 3(4):e1913. doi:10.1371/journal.pone.0001913



## IV DISKUSSION

### Diskussion zur Publikation 1

#### 1 Bedeutung der Differenzierung von Erregern der Rindertuberkulose

Weltweit wurden viele Fälle von zoonotischen Tuberkulosefällen beschrieben, und *M. bovis* gilt als der häufigste Verursacher der zoonotischen Tuberkulose beim Menschen (OLEA-POPELKA et al., 2017). Jedoch speziell in Deutschland konnte mit unterschiedlicher geografischer Verteilung oft auch *M. caprae* als Verursacher von humanen Tuberkulosefällen differenziert werden (KUBICA et al., 2003). Es ist wahrscheinlich, dass vor 2003 viele als *M.-bovis*-diagnostizierte Isolate eigentlich *M. caprae* zugeschrieben hätten müssen, nachdem bis dahin die Nomenklatur keine Unterscheidung erlaubte. Als Hauptreservoir der zoonotischen Tuberkulose wurden vor allem Rinder identifiziert und *M.-bovis* / *M.-caprae*-Infektionen konnten oft auf den Kontakt zu Rindern und den Konsum derer Produkte zurückgeführt werden (THOMPSON et al., 1993; COSIVI et al., 1998; THOEN et al., 2006; MICHEL et al., 2010; AL-THWANI & AL-MASHHADANI, 2016). Die Infektionsquelle ist ein entscheidender Punkt für die Prävention von Rindertuberkulose beim Menschen, und deren Kontrolle ist wichtig, um eine humane Infektion zu vermeiden und die Gesundheit von Mensch und Tier zu erhalten (MULLER et al., 2013). Tröpfchen- und Stallstaubinfektionen mit primärer Manifestation in der Lunge sind möglich, jedoch stellt die orale Aufnahme von Milch an Eutertuberkulose-erkrankter Kühe ebenfalls eine wichtige Infektionsquelle dar (RODWELL et al., 2008; Im Al-Saqr et al., 2016). Daher nimmt die chronisch-persistierende Rindertuberkulose Einfluss, neben dem Faktor – Gesundheit-Mensch – auch auf die landwirtschaftliche Produktion und den internationalen Handel mit Tieren und deren Produkten (SUAZO et al., 2003; CONLAN et al., 2015). Für eine effektive Bekämpfung der Rindertuberkulose sind vor allem die Epidemiologie des Erregers und die Übertragungswege von großer Bedeutung. Genetische Veränderungen, Adaptionen, Wirtswechsel, Transmission und globale Verteilung liefern hierzu detaillierte Informationen über den Erreger und erleichtern dessen Bekämpfung, setzen aber eine hinreichende Identifizierung und Charakterisierung des Erregers unterhalb der Speziesebene voraus (ZACZEK et al., 2014; ASGHARZADEH et al., 2016; BROUGHAN et al., 2016). Ferner, obwohl die Symptomatik einer humanen *M.-bovis*-Infektion cum grano salis einer Infektion mit *M. tuberculosis*

entspricht, ist eine Differenzierung zwischen den Erregern aufgrund möglichen Resistenzverhaltens für eine erfolgreiche Behandlung essentiell (ESTLER & SCHMIDT, 2007). Die Genome der MTC-Mitglieder sind jedoch zu 99,9 % identisch (GORDON et al., 1999), demnach ist die Entwicklung neuer effizienter und sicherer Tests zur Speziesdifferenzierung und Subtypisierung schwierig. Die häufig verwendeten Methoden des MIRU-VNTR und Spoligotyping zur Subtypisierung von Tuberkuloseerregern (PRODINGER et al., 2005) sind zeitaufwendig, laborabhängig und setzen oft eine erfolgreiche Anzucht und Isolierung mykobakterieller DNA aus Kulturproben voraus.

Domogalla et al. befassten sich erstmals mit der Subtypisierung von *M.-caprae*-Spezies anhand der genetischen Variabilität der RD4-Region. In ihrer Publikation wurde nachgewiesen, dass die RD4-Sequenz nicht genetisch gleich konserviert im *M.-caprae*-Genom vorliegt, und es wurden drei *M.-caprae*-Subtypen (Allgäu, Karwendel und Lechtal) aufgrund unterschiedlicher RD4-Variabilität benannt. Ferner entwickelte Domogalla et al. vier PCR-Ansätze, um die drei Subtypen von *M. caprae* differenzieren zu können (DOMOGALLA et al., 2013).

Diese Studie befasste sich mit der Entwicklung einer robusten und schnellen Multiplex-PCR, um den Arbeitsaufwand der vier PCR-Ansätze, die von Domogalla et al. vorgestellt wurden, zu verringern und eine gleichzeitige Differenzierung der drei bis dahin definierten *M.-caprae*-Subtypen zu ermöglichen. Darüber hinaus wurden die Möglichkeiten und Grenzen der RD4-Subtypisierung anhand von 241 *M.-caprae*-Isolaten aus Reservoirwirten (145 Rinder, 95 Rotwild) und einem „spill over“-Fall (Fuchs) aus Bayern und Österreich getestet. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass alle drei Subtypen geographisch unterschiedlich verteilt vorkommen. Außerdem finden sich die Subtypen bei Rindern und bei Rotwild gleichermaßen, aber mit deutlich unterschiedlicher Verteilung (Figure 3, Publikation) und ein Erregeraustausch zwischen den beiden Wirten kann angenommen werden. Da die RD4-Subtypen in beiden Reservoirwirten genetisch stabil sind, besteht die Annahme, dass sich die beschriebenen genetischen Variationen innerhalb des Wirts aufgrund einer „Rezeptor-Replikation“ entwickelt haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit empfehlen die genomische RD4-Region als diagnostisch-verlässlichen Marker für eine *M.-caprae*-Subtypen Differenzierung.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Multiplex-Subtypisierung von *M. caprae*-Isolaten anhand ihrer RD4-Variation zusammengefasst und die künftige Anwendbarkeit der Multiplex-PCR diskutiert. Zudem sind robuste Marker zur Subtypisierung

von *M.-caprae*-Spezies notwendig, um Erkenntnisse über die molekulare Epidemiologie eines Erregers zu erhalten und die RD4-Region soll im Folgenden als Marker erörtert werden.

## 2 Vorteile der RD4-Subtypisierung durch Multiplex-PCR-Ansatz

Die Mitglieder des MTC teilen eine Nukleotidsequenz-Ähnlichkeit von 99,95 % (GARNIER et al., 2003) und zählen somit zu den monomorphen Pathogenen, die nur geringe Sequenzunterschiede zwischen den Stämmen aufweisen (ACHTMAN, 2008). Alle Rindertuberkulosefälle aus den Bayerischen und Österreichischen Alpenregionen werden von drei genetischen *M.-caprae*-Subtypen verursacht, die durch spezifische Deletionen in der RD4-Region charakterisiert sind (SCHOEPP et al., 2012; DOMOGALLA et al., 2013).

Um eine einfache, schnelle und gleichzeitige Differenzierung von *M.-caprae*-Isolaten in einen der drei RD4-Subtypen „Allgäu“, „Lechtal“ und „Karwendel“ zu ermöglichen, wurde eine schnelle und zuverlässige Multiplex-PCR entwickelt. Das Protokoll der Multiplex-PCR wurde auf der Grundlage der bereits veröffentlichten vier Subtypen-PCRs entwickelt (DOMOGALLA et al., 2013) und zeigt eine hohe Spezifität und Sensitivität gegenüber *M. caprae*.

Alle bisher untersuchten *M.-caprae*-Isolate (n = 241) konnten eindeutig einem der drei RD4-Subtypen zugeordnet werden (Publikation 1). Auch ein Vergleich mit den Ergebnissen aus den Standardmethoden MIRU-VNTR-Genotypisierung und Spoligotyping zeigt identische Cluster und war mit den durch die Multiplex-RD4-PCR ermittelten Subtypen (n=40) völlig kongruent (Publikation 1). Die Genotypisierungverfahren mittels MIRU-VNTR und Spoligotyping werden zurzeit am häufigsten für molekulare epidemiologische Studien verwendet und ermöglichen durch den Nachweis verschiedener Loci eine Genotypisierung von Mykobakterienstämmen (MAZARS et al., 2001; HAUER et al., 2015). Die Subtypisierung anhand der RD4-Variationen ermöglicht im Gegensatz zum Spoligotyping auch eine Unterscheidung zwischen dem Lechtal- und dem Allgäu-Typ. Allerdings betrachtet die RD4-Analyse nur eine Genomregion. Eine weitaus genauere, genomweite Differenzierung von *M.-caprae*-Subtypen hingegen ist durch die Kombination aus verschiedenen Loci wie im MIRU-VNTR möglich (DOMOGALLA et al., 2013).

Das „flankierend zur Lechtal Deletion“ umfassende Amplifikat von ca. 250 bp bietet einen ausreichenden Längenunterschied zum Amplifikat - „flankierend zur Karwendel Deletion“ mit 700 bp, und diese beiden PCR-Ansätze bieten eine gute Ausgangsposition, um in nur einer gemeinsamen PCR kombiniert eingesetzt zu werden. Die Allgäu- und Karwendel-

Subtypen zeigen in einem Amplifikat ein und dieselbe Basenpaarlänge von 1.031 bp, die den „RD4-internen“ Sequenzabschnitten detektiert und eine Aussage über das Vorhandensein des mittleren Abschnitts der RD4-Sequenz ermöglicht. Lediglich das Allgäu-spezifische Amplifikat mit einer Länge von 88 bp, das den „RD4-internen linken Teil“ detektiert, sowie das 700-bp umfassende Amplifikat der „Karwendel-Deletion flankierenden“-PCR differenzieren diese beiden Subtypen. Auch hier zeigen beide Amplifikate einen deutlichen Sequenzlängen-Unterschied und ermöglichen eine eindeutige Abgrenzung. Eine Aussage über den vorliegenden RD4-Subtyp-Allgäu, Lechtal oder Karwendel ist demzufolge durch die Anwendung in einer einzigen PCR möglich. Der Multiplex-PCR-Ansatz verringert somit den Arbeitsaufwand erheblich im Vergleich zu den zuvor notwendigen vier einzelnen PCR-Ansätzen. Ferner kann, neben der schnelleren Subtypendifferenzierung, auch an Kosten für Labormaterial gespart werden, da alle Reaktionen in einem Röhrchen durchgeführt werden können. Die entwickelte Multiplex-PCR ermöglicht schnell und einfach nach Erhalt eines kulturellen Isolates die Abgrenzung von *M. bovis* und eine Differenzierung in einen der drei Subtypen von *M. caprae* aufgrund der Variation in der RD4-Sequenz. Diese Multiplex-PCR kann von jedem molekularbiologisch ausgerüsteten Labor einfach durchgeführt werden. Darüber hinaus ist die Methodik auch von klinisch-diagnostisch orientierten Routinelaboren bei Umgang mit nicht-infektiösem Material in Form von DNA integrierbar.

### 3 Grenzen der RD4-Subtypisierung durch Multiplex-PCR-Ansatz und Optimierungsvorschläge

Die benötigte mykobakterielle DNA aus Kulturproben stellt aufgrund des langsamen Wachstums der Mykobakterien und der Notwendigkeit eines Biosicherheitsstandard Stufe-3-(BSL3)-Labors für die schnelle Subtypisierung noch einen limitierenden Faktor dar. Eine molekulare Differenzierung direkt aus dem Untersuchungsmaterial wäre wesentlich schneller, einfacher und würde eine zusätzliche Absicherung bei einem negativen Kulturergebnis erbringen. Auch die bisher am häufigsten verwendeten molekularen Verfahren zur Genotypisierung (MIRU-VNTR und Spoligotyping) sind ebenfalls kulturabhängig und im Vergleich zur Multiplex-RD4-PCR mühsam und kostspielig (MAZARS et al., 2001; PRODINGER et al., 2005). Jedoch waren die Versuche, den Multiplex-RD4-PCR-Ansatz zur direkten Detektion und Subtypisierung von *M.-caprae*-DNA aus Gewebematerial zu verwenden, nicht erfolgreich (nicht veröffentlichtes Teilprojekt 1). Wie bereits von der Detektion von MTC-Genomen durch PCR bekannt ist, ist das Hauptproblem von Gewebematerial die geringe Menge an intakter bakterieller DNA in einer Gewebeprobe und die inhomogene Verteilung von Bakterien im Versuchsmaterial (PARRA et al., 2008). Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass die mykobakterielle Population im Wirt aufgrund auftretender Mikroevolution heterogen verteilt ist (PEREZ-LAGO et al., 2014; STUCKI et al., 2015; SSENGOOBA et al., 2016). Darüber hinaus stellt der Mangel an Sensitivität mancher PCR-Ansätze oft ein weiteres Problem zur Detektion aus Gewebematerial dar. Die Ergebnisse zeigten, dass der Multiplex-RD4-PCR-Ansatz eine sensible und spezifische Methode zur Subtypisierung von *M.-caprae*-Kulturoisolen darstellt. Jedoch um eine von der Bakterienkultur unabhängige Differenzierung aus Gewebematerial zu ermöglichen und die Sensitivität des hier entwickelten Multiplex-PCR-Ansatzes zur Detektion von mykobakterieller DNA direkt aus klinischem Gewebe zu erhöhen, wäre eine für die Diagnostik erforderliche Optimierung nötig. Eine DNA-Gewinnung aus größeren Gewebemengen, um die Trefferwahrscheinlichkeit in der PCR zu erhöhen, wurde von Fell et al. bereits publiziert (FELL et al., 2016). Darüber hinaus könnte eine verbesserte DNA-Extraktion und ein gezieltes Ansteuern („fishing“) bakterieller DNA aus dem Überschuss der zellulären Gewebe-DNA sehr hilfreich sein, um eine Anreicherung bakterieller DNA zu erreichen. Dies würde die Sensitivität steigern, und die Entwicklung einer anschließenden Multiplex-real-time-RD4-PCR wäre ebenfalls möglich, um den differenziellen Nachweis mykobakterieller DNA direkt aus betroffenen Gewebeproben zu erlauben.



#### 4 Epidemiologie der *Mycobacterium-caprae*-RD4-Subtypen

Für eine effektive Bekämpfung der Tuberkulose beim Rind sind vor allem die Epidemiologie des Erregers und die Übertragungswege von großer Bedeutung. Die Analyse von genetischen Variationen kann genutzt werden, um epidemiologische Verteilungsmuster oder sogar den Ursprung einer Infektionskette zu ermitteln. Die RD4-Region ist eine variable Region im Genom von *M. caprae*, die nicht essentiell für das Wachstum und die Infektiosität des Bakteriums notwendig ist (DOMOGALLA, 2014). Derzeit ist noch wenig über mögliche Übertragungswege von *M. caprae* bekannt. In dieser Arbeit wurde daher eine große Anzahl ( $n = 241$ ) von *M.-caprae*-Isolaten (Rinder, Rotwild und ein Fuchs) aus dem bayerischen und österreichischen Alpenraum in einem Zeitraum von 1999 bis 2014 (Publikation 1) genutzt, um neue Erkenntnisse über die Epidemiologie von *M. caprae* zu erhalten.

Die Ausprägung der RD4 erlaubt eine Einordnung in einen der drei *M.-caprae*-RD4-Subtypen und dieser wurde mit der geographischen Herkunft der Isolate verglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die RD4-Subtypen von *M. caprae* geographisch verteilt in Rind und Rotwild gleichermaßen im Alpenraum auftreten und eine Zuordnung der RD4-Subtypen zum geographischen Ursprung der Isolate möglich ist. Die geographische Zuordnung der RD4-Subtypen aus dem bayerischen Alpenraum ist mit der bereits beschriebenen Verteilung nach Domogalla et al. vergleichbar (DOMOGALLA et al., 2013). Der Karwendel-RD4-Subtyp bei Rind und Rotwild ist ausschließlich im Karwendelgebirge (Garmisch-Partenkirchen), Bad Tölz und Achental zu finden (Figure 3, Publikation). Es ist fraglich, wie sich der Karwendel-RD4-Subtyp im Rotwild in dieser Region entwickeln konnte und gibt Anlass für weitere Untersuchungen. Der Nachweis der gleichen RD4-Subtypen in Isolaten aus Rind und Rotwild erlaubt die Annahme eines Erregeraustausches zwischen Nutz- und Wildtieren. Allerdings ist die Identifikation eines Ursprungswirts in der Infekt-Kette derzeit noch nicht möglich. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass wilde Hirsche in den USA mit verschiedenen *M.-bovis*-Stämmen infiziert sind, welche sie durch den Kontakt zu Rindern erworben haben. In der Folge konnte ein verstärkter Erregeraustausch zwischen den Tieren zusammen mit Wirtswechsel auf die Rinder beobachtet werden (TSAO et al., 2014). Erst kürzlich wurden in Minnesota ähnliche Übertragungsfunde zwischen Rindern und Weißwedelhirschen gemeldet (GLASER et al., 2016).

Die Ausprägung des Allgäu-RD4-Subtyps bei Rindern aus dem Tiroler Zillertal (Bezirk Schwaz) (Figure 3 in Publikation 1) konnte auf den Viehhandel zurückgeführt werden und muss nicht unter dem endemischen Fokus betrachtet werden. Es ist unbestreitbar, dass

Viehhandel und der damit verbundene Tiertransport ein großes Risiko für einen Erregeraustausch darstellt. Eine Tierhandel assoziierte-*M.-bovis*-Übertragung wurde bereits bei bTB-Fällen in Großbritannien (GILBERT et al., 2005; JOHNSTON et al., 2005) oder Frankreich (PALISSON et al., 2016) beschrieben.

Eine Überschneidung bezüglich der Lokalisation der Rinderbestände bzw. der Erlegungsorte vom Rotwild und dem Auftreten der RD4-Subtypen kann für die RD4-Subtypen Allgäu und Lechtal festgestellt werden. Der Lechtal-RD4-Subtyp zeigte eine deutliche, fast gleiche Verteilung auf beide Reservoirwirte (Figure 3 in Publikation 1).

Nach einer Schätzung lag in Österreich die Prävalenz von mit *M.-caprae*-infiziertem Rotwild im oberen Lechtal bei 23 % (SCHOEPF et al., 2012). *M.-caprae*-infiziertes Rotwild konnte neben dem Tiroler Lechtal, das als Hotspot-Area gilt (FINK et al., 2015), auch in kleineren Gebieten, wie in der Stillachalp, den Rappenalp-Tälern im Oberen Allgäu und dem Silbertal und Klostertal im Vorarlberg, sowie im Isartal des Karwendelgebirges identifiziert werden. Hierbei ist vor allem das „wandernde Rotwild“ ein wichtiger Faktor. Projektergebnisse zeigen, dass ein Teil der Rotwildpopulation von ihrem Winterstreifgebiet in ein separates Sommerstreifgebiet zieht, während ein anderer Teil ganzjährig etwa dasselbe Gebiet nutzt. Ein erheblicher Anteil des Rotwildes zieht bei seinen saisonalen Wanderungen in Nachbarregionen oder in angrenzende Nachbarländer. Aber auch bei dem standorttreuen Rotwild gehen die Streifgebiete teilweise über Landkreise und Staatsgrenzen hinaus. Auch haben Witterungs- und Beunruhigungsfaktoren Einfluss auf die Wanderbewegungen, Wanderrouen und tages-/jahreszeitliche Aktivitätsmuster (REIMOSER, 2015). Es konnten bisher noch keine gesicherten Aussagen getroffen werden, ob sich die Wildtiertuberkulose in den kleineren Gebieten regional auf sehr niedrigem Niveau etabliert hat und ständig präsent ist, oder ob es sich um regelmäßige frische Einträge durch wanderndes Rotwild aus betroffenen Hotspot-Regionen in ein grundsätzlich tuberkulosefreies Gebiet handelt (NIGSCH, 2016). Vor allem bestimmte Management-Strategien, wie die Winterfütterungsstellen und eine damit einhergehende saisonale, hohe lokale Tierdichte sind maßgeblich für die Wildtiertuberkulose-Weiterverbreitung verantwortlich und stehen besonders in der Kritik (SCHOENING et al., 2013; FINK et al., 2015). An den Winterfütterungsplätzen herrschen ideale Bedingungen für einen Erregeraustausch - feucht, kühl, schattig und ein hohes Tieraufkommen auf engstem Raum, das sich über einen Zeitraum von mehreren Monaten trifft. Daher ist die Änderung des Fütterungsmanagements ein zentraler Punkt, wenn eine wirksame Unterbrechung des Infektionszyklus innerhalb des

Rotwilds erreicht werden soll. Ferner ist zu bedenken, dass die Tuberkulose sich auch in aktuell freien Gebieten mit großen Fütterungsplätzen etablieren kann, wenn nur wenige erkrankte Tiere aus benachbarten Regionen eine Infektion in gesunde Bestände einschleppen (NIGSCH, 2016).

Auch eine *M.-caprae*-Ansteckung und ein Erregeraustausch auf der Alm während der Sömmerung sind sehr wahrscheinlich (SCHELLNER, 1956; PHILLIPS et al., 2003; KING et al., 2015), wobei hier eher von einem indirekten Erregeraustausch als von einem direkten Kontakt als Übertragungsquelle zwischen Rotwild und Rind ausgegangen werden muss (FINK et al., 2015). Die einzige derzeit beschriebene Übertragung einer *M.-caprae*-Infektion mit unidirektionalem Übertragungsweg vom Rind zum Rotwild stammt aus Italien (CHIARI et al., 2014). Die große Anzahl an untersuchten *M.-caprae*-Feldisolaten zusammen mit der Tatsache, dass eine RD4-Host-Spezifität nicht nachgewiesen werden konnte, lässt auf eine bidirektionale Übertragung der drei *M.-caprae*-RD4-Subtypen zwischen Rind und Rotwild schließen. Dennoch sind unabhängige Infektketten in einer Wirtspopulation klar zu beobachten.

Bedingt können Rückschlüsse über mögliche Übertragungswege anhand des Alters gezogen werden. Rotwild-Kälber beispielsweise haben ein sehr geringes Ansteckungsrisiko und dies bestätigt sich auch in Studien in anderen Ländern (LUGTON et al., 1998). In Tirol wurde beispielsweise im Rahmen der TBC-Überwachung (ERA NET) nur ein einziges positives Rotwild-Kalb gefunden, dessen Muttertier eine fortgeschrittene TBC aufwies und als plausible Erklärung für eine Ansteckung gilt (NIGSCH, 2016). Weiterhin kann gefolgert werden, dass Euter-TBC bei Muttertieren eher selten ist, ansonsten müssten häufiger positive Kälber gefunden werden. Hingegen wurden einjährige Jungtiere (Schmaltiere und Schmalspießer) mit TBC in Vorarlberg vermehrt nachgewiesen, und die Pathologiebefunde deuteten auf einen frühestmöglichen Ansteckungszeitpunkt der Einjährigen zwischen Januar und März ihres ersten Winters hin. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere etwa 7 bis 10 Monate alte Kälber und hatten das erste Mal bei einer Winterfütterung Kontakt mit Artgenossen aller Altersgruppen. Dies bestätigt, dass die Fütterung bei der Ansteckung von Jungtieren eine wichtige Rolle spielt (NIGSCH, 2016). Auch anhand der Ausprägung und Ausdehnung der tuberkulösen Organläsionen kann grob auf den Ansteckungszeitpunkt geschlossen werden. Infektionsversuche bei Weißwedelhirschen zeigten erste erkennbare Veränderungen 6 bis 8 Wochen nach einer *M.-bovis*-Ansteckung, während die Bildung dünnwandiger Abszesse erst 11 Monate nach der Ansteckung auftraten (PALMER et al.,

2002). Auch die Lokalisation von Läsionen kann Aufschluss über einen möglichen Übertragungsweg geben. So kann bei einer Läsion in der Brusthöhle von einer Infektion durch Inhalation von erregerhaltigen Aerosolen ausgegangen werden. Hingegen lassen Läsionen in den Mesenteriallymphknoten eher auf eine orale Infektion schließen (BIET et al., 2005).

Der Effekt des „spill over“- von einer Reservoirspezies zu einer anderen, aber nicht als Reservoirwirt definierte Spezies - konnte für einen *M.-caprae*-infizierten Fuchs, der im südwestlichen Allgäu erlegt wurde, gezeigt werden. Für das *M.-caprae*-Isolat dieses Fuchses konnte der Lechtal-RD4-Subtyp bestimmt werden (Tabelle 3, Fig. 3 in Publikation 1). Der Lechtal-RD4-Subtyp konnte somit neben Rind und Rotwild (DOMOGALLA et al., 2013), auch bei einem Fuchs nachgewiesen werden, was das breite Wirtsspektrum von *M. caprae* verdeutlicht (Tabelle 3, Fig. 3 in Publikation 1). Diese Mykobakterien-Infektion wurde höchstwahrscheinlich durch die Aufnahme von einem infizierten Beutetier/Kadaver erworben. Die Möglichkeit der Aufnahme eines Erregers über Kadaver wurde für Ratten bereits beschrieben (LITTLE et al., 1982). Es bleibt zunächst spekulativ, ob die mykobakterielle „Replikation innerhalb einer Reservoirwirtpopulation“ (Rind oder Rotwild) durch Adaption zum RD4-Sequenzverlust mit Ausbildung des beschriebenen Lechtal-RD4-Subtyps geführt hat. Eine effektive Tuberkulosekontrolle setzt voraus, dass die genaue Rolle von Wild- und Nutztieren in der Infekt-Kette bekannt ist, und nur so kann die richtige Infektionsquelle bekämpft werden (LA CORNER, 2006).

## 5 Überprüfung von *Mycobacterium-caprae*-Isolaten aus Patienten am LGL

Wie bereits unter Abschnitt 1 der Diskussion erläutert wurde, ist die Analyse von genetischen Variationen im Genom von *M.-caprae*-Spezies notwendig, um Erkenntnisse über die molekulare Epidemiologie eines Erregers zu erhalten. Die RD4-Region als variable Region im Genom von *M. caprae* kann bislang unbekannte Varianten aufweisen, und aus diesem Grund wurden anhand des im Rahmen der Publikation 1 etablierten Multiplex-RD4-PCR-Protokolls weitere *M.-caprae*-Isolate getestet (nicht veröffentlichtes Teilprojekt 2; Ergebnisse der Multiplex-RD4-PCR-Ansätze sind in Tabelle A 1 hinterlegt).

Drei humane-*M.-caprae*-Isolate aus dem Jahr 2014 wurden durch ihre RD4-Ausprägung dem Allgäu-Subtyp zugeordnet. Die genaue Herkunft der Isolate, das Alter der jeweiligen Patienten, sowie weitere Informationen konnten aufgrund datenschutzrechtlicher Anonymisierung nicht ermittelt werden. Über eine mögliche Ansteckung lässt sich hier nur spekulieren, und ein Nachweis für einen Erregeraustausch zwischen Mensch und Nutz-/Wildtier kann nicht erbracht werden. Es lässt sich aber festhalten, dass die RD4-Sequenz bei allen drei humanen *M.-caprae*-Isolaten komplett vorhanden vorliegt, soweit das mit Hilfe der PCR-Differenzierung nachweisbar ist. Eine Sequenzierung des Amplifikats des RD4-internen Sequenzbereichs mit 1.031 bp wurde für zwei humane *M.-caprae*-Isolate (14-0040819 und 14-0040820) und vier zufällig ausgewählte Rinder (13-0036281, 13-0036287, 13-0098693 und 14-0024405), die als Allgäu-RD4-Subtypen differenziert wurden, durchgeführt. Die DNA-Sequenz dieser 1.031-bp *M.-caprae*-Amplifikate wurde in deren Aminosäure (AS)-Sequenz übersetzt und verglichen (Abbildung 12).

13-0036281	SLMVTDAVIRLAVAAAAVVI GWGLAGYLWAATAGAVAWLLMLMASPTARSAAASLLTPGGI
13-0036287	SLMVTDAVIRLAVAAAAVVI GWGLAGYLWAATAGAVAWLLMLMASPTARSAAASLLTPGGI
13-0098693	SLMVTDAVIRLAVAAAAVVI GWGLAGYLWAATAGAVAWLLMLMASPTARSAAASLLTPGGI
14-0024405	SLMVTDAVIRLAVAAAAVVI GWGLAGYLWAATAGAVAWLLMLMASPTARSAAASLLTPGGI
14-0040819	SLMVTDAVIRLAVAAAAVVI GWGLAGYLWAATAGAVAWLLMLMASPTARSAAASLLTPGGI
14-0040820	SLMVTDAVIRLAVAAAAVVI GWGLAGYLWAATAGAVAWLLMLMASPTARSAAASLLTPGGI
	*****

**Abbildung 12:** Alignment der Aminosäuresequenz aus der RD4-Zentralregion von *M.-caprae*-Isolaten des Allgäu-Subtyps. Die Aminosäuresequenzen der zwei humanen *M.-caprae*-Isolate (14-0040819 und 14-0040820) zeigen eine 100 %ige Übereinstimmung mit den vier *M.-caprae*-Isolatgenom-Sequenzen aus Rindern. (\* repräsentieren eine AS-Übereinstimmung)

Es konnte in dem 1.031-bp DNA-Fragment aus dem internal RD4-Bereich eine 100%ige Aminosäure-Übereinstimmung zwischen den Human- und Rinderisolaten gezeigt werden.

## 6 Die RD4-Region als stabiler Marker?

Eine Differenzierung von MTC-Erregern über den RD4-Locus ist mit entsprechendem Primer-Design im Hinblick auf die bisher bekannten RD4-Variationen möglich und kann mit dem Multiplex-RD4-PCR-Ansatz schnell und einfach erfolgen. Die bis jetzt bestätigten Deletionen in der RD4-Sequenz im Genom von alpinen *M.-caprae*-Isolaten lieferten kein falsches Ergebnis. Auch zeigten sich die RD4-Subtypen genetisch stabil in Rind und Rotwild, und die Primer-Sequenzen, die für den Nachweis der Deletionen der *M.-caprae*-Isolate ausgewählt wurden, führten zu einer eindeutigen Spezies- und Subtypen-Differenzierung (Publikation 1). Allerdings berichtete Domogalla bereits in ihrer Arbeit von einem *M.-caprae*-Isolat aus einem rumänischen Rind, das keine Subtypisierung in einen der drei beschriebenen RD4-Subtypen erlaubte (DOMOGALLA, 2014).

Dieses *M.-caprae*-Isolat aus dem rumänischen Rind gab Anlass für weitere Untersuchungen (Tabelle 9) (nicht veröffentlichtes Teilprojekt 2). Die beiden intern-liegenden RD4-PCR Primer ergaben ein 1.031-bp umfassendes-Amplifikat und detektieren den Allgäu- bzw. den Karwendel-RD4-Subtyp. Jedoch konnte mit dem Multiplex-RD4-PCR-Ansatz weder das RD4-internal left part Amplifikat mit 88 bp, noch die flankierenden 243 bp zur 5-kb Deletion des Karwendel Subtyps amplifiziert werden (Tabelle 9). Dies lässt auf eine neue, von den bisher beschriebenen Karwendel-Deletionen abweichende weitere Deletion im vorderen Teil der RD4-Sequenz schließen. Für drei weitere *M.-caprae*-Isolate aus Rotwild konnte mit dem Multiplex-RD4-PCR-Ansatz überhaupt kein Amplifikat erzeugt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass *M. caprae* in und um den Bereich der RD4-Region weitere Variationen zu den bisher beschriebenen RD4-Deletionen aufweist. Beobachtungen in einer Studie von Rodríguez et al. deuteten auf Ähnliches hin (RODRIGUEZ et al., 2011).

**Tabelle 9: RD4-Subtypen Allgäu, Karwendel und Lechtal im Vergleich zu den Multiplex-RD4-PCR Ergebnissen von *M.-caprae*-Isolaten aus Rind und Rotwild, die keine Subtypisierung in einen der drei RD4-Subtypen erlauben**

RD4-Subtyp	Herkunft Regierungs- bezirk	Isolat- Wirt	Jahr	RD4 internal left part (88bp)	RD4 internal central part (1.031bp)	RD4 38-kb deletion flanking (700bp)	RD4 5-kb deletion flanking (243bp)
Allgäu	OA			+	+	-	-
Karwendel	TÖL			-	+	+	-
Lechtal	OA			-	-	-	+
Isolat ID							
13-0035877-001-01	Rumänien	Rd	2013	-	+	-	-
13-0104545-001-01	GAP	RW	2013	-	-	-	-
13-0108365-001-01	WM	RW	2013	-	-	-	-
13-0108370-001-01	WM	RW	2013	-	-	-	-

Rd = Rind, RW = Rotwild, OA = Oberallgäu, TÖL = Bad Tölz, GAP = Garmisch-Partenkirchen, WM = Weilheim-Schongau

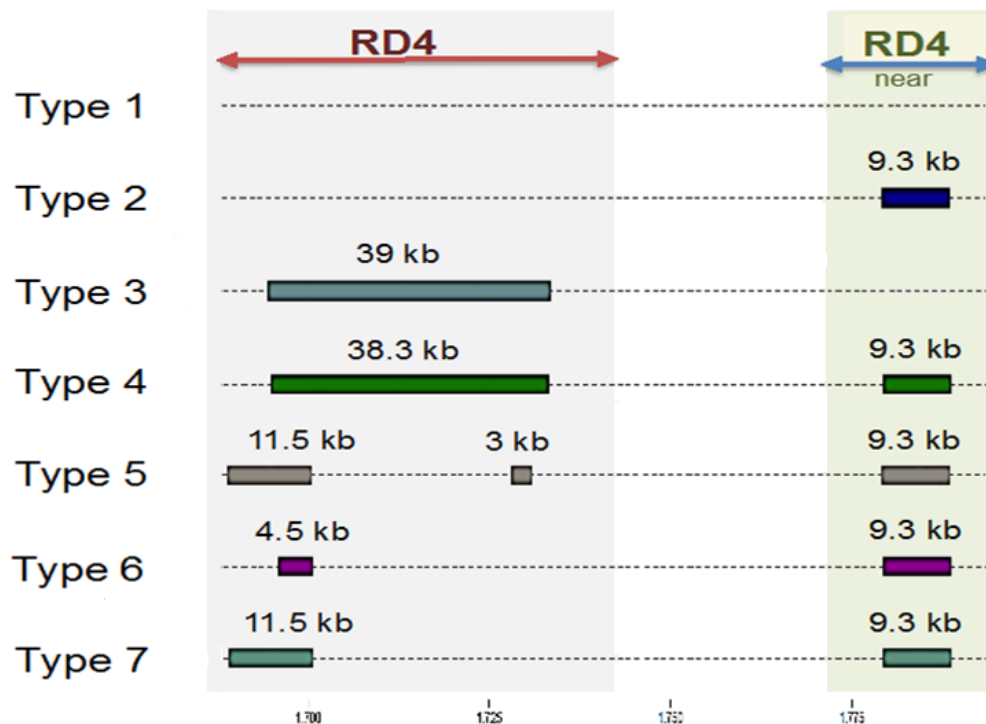
Zur Überprüfung eventuell noch unbekannter genetischer Variationen in und um die RD4-Region wurden im Zusammenhang mit dem Projekt „Gesamtgenomsequenzierung und Erstellung einer kompletten *M.-caprae*-Genomsequenz“ (Publikation 2) weitere *M.-caprae*-Genomvergleiche auf Gesamtgenomebene aus Rind und Rotwildisolaten vorgenommen (Abschnitt 7 und folgende).



## 7 RD4-Subtypen und neue Deletionen

### *nicht veröffentlichte Ergebnisse*

Im Rahmen der Erstellung von sequenzierfähigen Illumina Genbanken und der Genomsequenzierung von über 300 *M.-caprae*-Isolaten aus Mensch, Rind, Rotwild und Schaf wurde der Aufbau der RD4-Region genauer untersucht (nicht veröffentlichtes Teilprojekt). Die bioinformatische Auswertung von bisher 246 Isolatgenomen identifiziert in jedem Isolat genetische Abweichungen zu dem veröffentlichten *M.-caprae*-Referenzgenom (Publikation 2). In den untersuchten *M.-caprae*-Isolaten konnten neben den bisher drei RD4-Varianten, vier neue Varianten in und um die RD4-Region gefunden und damit insgesamt sieben RD4-Varianten erfasst werden (Abbildung 13) (Häufigkeit des Vorkommens der RD4-Typen und Wirtstiere der *M.-caprae*-Isolate sind Abbildung A 1 hinterlegt). Alle bisher untersuchten Isolate lassen sich einem von den sieben verschiedenen Typen zuordnen, in denen unterschiedlich große Bereiche der genomischen Sequenz an verschiedenen Positionen deletiert sind. Insgesamt finden wir nur 5 *M.-caprae*-Isolate, die keine Deletion im Bereich der RD4-Region aufweisen (Typ 1). Drei von diesen Isolaten stammen aus Rindern und zwei wurden aus Menschen isoliert. Demnach weist das *M.-caprae*-Genom des Typ 1 keine Deletionen im variablen Bereich um die RD4-Region auf und lässt vermuten, dass es sich hier um einen Vorläufer der *M.-caprae*-Subtypen handelt (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2007 a). Der Typ 2 ähnelt dem Typ 1 sehr, jedoch fehlt diesem direkt hinter der vollständig vorhandenen RD4-Region eine 9,2-kb umfassende Genomsequenz (Abbildung 13). Diese 9,2-kb umfassende Deletion ist in allen RD4-Typen identisch, in denen sie gefunden wurde (Typ 2, 4, 5, 6, 7). Eine genauere Unterscheidung des Typ 1 von Typ 2 ist mit dem Multiplex-RD4-PCR-Ansatz demnach nicht möglich, da beide Typen die komplette RD4-Sequenz aufweisen und eine Differenzierung mit den beiden in der RD4-Region liegenden Primern folglich nicht möglich ist und sie beide einfach als Allgäu-RD4-Subtyp detektiert werden würden.



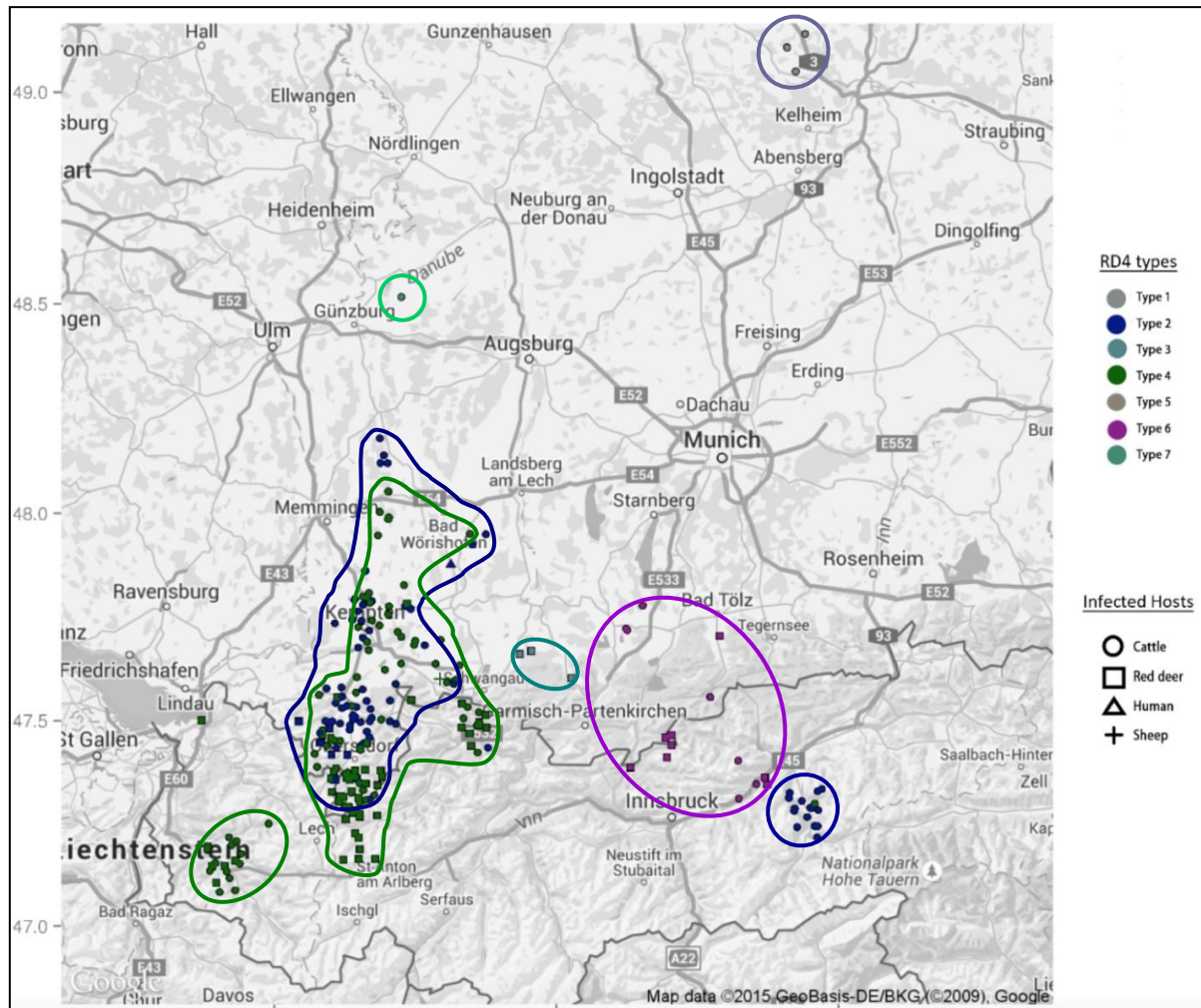
**Abbildung 13: RD4-Typen und Aufbau der RD4-Region bei alpinen *M.-caprae*-Isolatgenomen.** Ein Genomsequenzabgleich zwischen dem *M.-caprae*-Referenzgenom und dem der 246 Isolate erlaubt die präzise Definition der RD4-Region und der Existenz verschieden großer Deletionen in und um den RD4-Sequenzbereich. Insgesamt wurden sieben verschiedene Typen im RD4-Bereich identifiziert, die hier schematisch dargestellt sind. Die rechteckigen Bereiche zeigen eine Deletion im *M.-caprae*-Genom an. Die Abbildung wurde vom Genzentrum (Lafuga) zur Verfügung gestellt

Der Typ 4 zeigt eine 38-kb große Deletion im Bereich der RD4-Region und entspricht dem bekannten Lechtal-RD4-Subtyp. Die Deletion des Typ 3 zeigt im Vergleich zu Typ 4 (Lechtal-RD4-Subtyp) eine um ca. 350 bp größere Deletion im linken und eine um ca. 300-bp größere Deletion im rechten Bereich (Abbildung A 2). Dieser Typ 3 wurde vorerst als „extended“(XL)-Lechtal bezeichnet und konnte aus einem Rotwild (13-0108370-001-01) isoliert werden (Tabelle 9, Diskussion, Abschnitt 6). Die Typen 5 und 7 zeigen im vorderen Bereich der RD4-Region eine weit größere Deletion, als die bisher bekannte Karwendel-RD4-Deletion (Typ 6) und entsprechen dem Genom des Isolats aus dem rumänischen Rind. Der Bereich um die RD4-Region von *M. caprae* zeigt eine starke Variabilität von wenigen Basenpaaren bis zu mehreren Kilobasenpaaren in der ca. 20.000 Nukleotide umfassenden Sequenz. Dennoch konnten alle ca. 300 *M.-caprae*-Isolate eindeutig einem von nur sieben Typen zugeordnet werden. Dies spricht dafür, dass die Entwicklung eines völlig neuen RD4-Typs eher ein sehr seltenes Ereignis ist, das in unserem gesamten Datenbestand nur siebenmal

stattgefunden hat. Unter der Annahme, dass der Verlust genetischen Materials in Mykobakterien sehr selten auftritt, ist die Evolution dieser Deletionen in *M. caprae*, im zeitlichen Verlauf und unter Einfluss der Wirtsspezies, sowie etwaiger Wirtswechsel noch völlig unklar. Zunächst erlaubt aber die Verwendung der RD4-Regionsequenzen eine Charakterisierung der Genome verschiedener *M.-caprae*-Isolate und -Stämme. Bemerkenswert ist aber, dass eine Charakterisierung der bis jetzt gefundenen RD4-Typen über die klassischen Verfahren nicht möglich war.

## 7.1 Geographische Verteilung der neuen RD4-Typen

Generell wird jeder RD4-Typ nur in einer begrenzten geografischen Region gefunden (Abbildung 14). Das Genom vom Typ 1 beispielsweise wurde ausschließlich bei Günzburg gefunden und Typ 6 (Karwendel-RD4-Subtyp) wird nur im Karwendel Gebirge isoliert. Der Typ 2 (Allgäu-RD4-Subtyp) konnte neben dem Allgäu, auch in österreichischen Rindern aus dem Tiroler Zillertal (Bezirk Schwaz) (Figure 3 in Publikation 1) detektiert werden. Das Vorkommen dieses Allgäu-RD4-Subtyps im Zillertal konnte eindeutig auf den Viehhandel zurückgeführt werden (Publikation, Diskussion Abschnitt 4) (GILBERT et al., 2005; JOHNSTON et al., 2005; PALISSON et al., 2016). Der Typ 4, der dem *M.-caprae*-Lechtal-RD4-Subtyp entspricht, konnte bisher am häufigsten identifiziert werden und wurde sowohl im Lechtal, als auch im Allgäu gefunden (DOMOGALLA et al., 2013). Obwohl sich die Fundorte beider *M.-caprae*-Typen weit überschneiden, gibt es jedoch einen auffälligen Unterschied zwischen beiden, der bislang noch nicht geklärt werden konnte. Der Typ 2 (Allgäu-RD4-Subtyp) wird nur sehr selten im Rotwild gefunden, während beim Typ 4 etwa die Hälfte der Proben aus Rotwild stammt. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass sich Typ 4 mit dem Verlust eines kleinen Teiles seiner genetischen Information aus dem Typ 2 entwickelt hat (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2007 a).



**Abbildung 14: Vorkommen der RD4-Typen und geographische Verteilung der 246 *M. caprae*-Isolate im bayerischen und österreichischen Alpenraum. Jedes sequenzierte *M. caprae*-Isolatgenom konnte einem von sieben RD4-Typen zugewiesen werden. Der Fundort und die Wirtspezies jedes Isolates sind in der Karte markiert. Die Abbildung wurde vom Genzentrum (Lafuga) zur Verfügung gestellt**

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verschiedenen RD4-Typen bevorzugt in bestimmten Regionen gefunden werden. Es kann angenommen werden, dass sich die verschiedenen *M. caprae*-Genome lokal entwickelt und im Alpenraum ausgebreitet haben. Hierfür spricht die Ausbreitung des jeweiligen *M. caprae* Typs in einem geographisch begrenzten Gebiet. Andere, genetisch aufgrund der Sequenzdaten der RD4-Region nichtverwandte Isolate, können Hinweise auf Übertragungswege zwischen Rindern durch Tierhandel (GILBERT et al., 2005; JOHNSTON et al., 2005; PALISSON et al., 2016) oder zwischen Rind und Rotwild durch Beweidung von Almen geben (SCHELLNER, 1956; PHILLIPS et al., 2003; KING et al., 2015).

## **7.2 Einfluss der neuen RD4-Typen in *Mycobacterium-caprae*-Genomen auf die Differenzierungsmöglichkeiten mittels des Multiplex-PCR-Ansatzes**

Die hohe genetische Variabilität im Bereich der RD4-Region und die Annahme, dass ein Verlust von genetischen Material in Mykobakterien eher selten auftritt, bekräftigt die Verwendung der RD4-Region als genomischen Marker für eine *M.-caprae*-Subtypen-Differenzierung und als wichtige genetische Region für weitere epidemiologische Untersuchungen. Soll jedoch eine genauere *M.-caprae*-Differenzierung unter Verwendung des RD4-Locus durch einen PCR-Ansatz erfolgen, die der Multiplex-RD4-PCR-Ansatz und die drei RD4-Subtypen nicht ermöglichen, ist ein entsprechendes Primer-Design im Hinblick auf die jetzt bekannten RD4-Variationen (Typ 1 bis 7) nötig. Ansonsten führt die Verwendung von Primer-Sequenzen, die nicht an die Deletionen der *M.-caprae*-Isolate angepasst sind, zu keinem Ergebnis (Tabelle 9, Abschnitt 6) (Der Bereich der Sequenz-Detektion des in der Publikation etablierten Multiplex-RD4-PCR-Ansatzes ist in Abbildung A 3 dargestellt). Auch in der aktuellen Fassung der amtlichen Methodensammlung wird bereits darauf hingewiesen, dass es Einschränkungen hinsichtlich eines *M.-caprae*-Genotypes gibt, der in Bayern nachgewiesen wurde und sich durch die RD4-PCR nicht von *M. bovis* unterscheiden lässt.



## 8 Ausblick

Aufgrund der hohen genetischen Variabilität im Bereich der RD4-Region und der erhöhten Deletionsrate in und um diesen Locus, besteht die Annahme auf der Entwicklung weiterer in dieser Studie noch nicht nachgewiesener, neuer Varianten auf Basis der Gesamtgenom-Sequenzen. Von besonderem Interesse ist, dass die in dieser Arbeit detektierte 9,2-kb umfassende Deletion im Genom der Typen 2, 4, 5, 6, und 7 eine neue Deletion nahe der RD4-Region (RD4 near) von *M.-caprae*-Isolaten darstellt. Zuvor waren lediglich die ursprünglich angenommene 12,7-kb RD4-Deletion für *M. caprae* (BROSCH et al., 2002; ARANAZ et al., 2003) und die für die drei RD4-Suptypen charakteristischen Deletionen von bis zu 38 kb bekannt (DOMOGALLA et al., 2013). Die detektierte zusätzliche 9,2-kb Deletion in der genomischen Sequenz nahe der RD4-Region und die neuen Varianten in der RD4-Region lassen daher annehmen, dass diese nicht essentiell für das Bakterienwachstum sind und Auswirkungen auf die Wirtsspezifität für Rind oder Rotwild haben (Abbildung 13, Diskussion, Abbildung A 1). Zukünftige Analysen auf Proteinebene werden notwendig sein, die hier geschilderten Deletionen und noch mögliche andere Sequenz-/Genverluste im Gesamtgenom genauer zu analysieren und unser Verständnis für die Entwicklung und Virulenz von *M. caprae* zu verbessern (DOERKS et al., 2012; LEW et al., 2011; GENGEBACHER et al., 2014). Eine essentielle Basis hierbei stellt die komplette Gesamtgenomsequenz von *M. caprae* dar (Publikation 2), die als optimale Referenz-Genomsequenz für zukünftige, weltweit *M.-caprae*-spezifische Analysen verwendet werden kann (BENTLEY, 2006; SUPPLY et al., 2013; GALAGAN, 2014).

## Diskussion zur Publikation 2

### 1 Bedeutung der Gesamtgenomsequenzierung und SNP-Typisierung

Die im Jahr 1998 veröffentlichte komplette Genomsequenz von *M. tuberculosis* H37Rv (COLE et al., 1998) revolutionierte die Tuberkuloseforschung. Es hat jedoch bis 2010 gedauert, unterdessen weitere 21 Gesamtgenomsequenzen veröffentlicht wurden bis ein erster auf Gesamtgenomsequenzierung- (WGS, Whole Genome Sequencing) basierender phylogenetischer Stammbaum des MTC publiziert wurde (COMAS et al., 2010). Inzwischen wurden fast 10.000 Einzelnukleotid-Unterschiede (SNPs) in den 21 Genomen entdeckt, und mehr als 3.000 Draft-Genomsequenzen wurden seither erzeugt (STUCKI & GAGNEUX, 2013). Die Gesamtgenomsequenz repräsentativer MTC-Mitglieder als Ausgangspunkt, ermöglichten es vollständige Sätze an phylogenetisch-informativen-abstammungsspezifischen SNPs aus den umfassenden WGS-Daten zu erstellen (STUCKI et al., 2012). Diese SNPs können jetzt als molekulare Marker bei der Differenzierung von MTC-Isolaten genutzt werden und erlauben ein schnelles Screening, auch umfangreicher MTC-Sammlungen. Generell kann durch den Vergleich von Gesamtgenomsequenzen und der Detektion der zahlreichen, genetischen Diversitäten eine erhöhte Spezifität für die Speziesdifferenzierung innerhalb des MTC erzielt werden. Darüber hinaus können detaillierte Informationen zur Subtypisierung innerhalb der Spezies gewonnen werden. Dies ermöglicht epidemiologische Zusammenhänge und Aussagen zur bakteriellen Evolution relativ sicher zu treffen. Eine molekularbiologische Feincharakterisierung von *M.-caprae*-Isolaten würde unter anderem zu einer genaueren Klärung des Erregeraustausches zwischen Rind und Rotwild und molekularen Ereignissen bei Wirtswechsel führen (STUCKI et al., 2015). Von Bedeutung ist hierbei nicht nur der Vergleich der RD4-Region, sondern die genomweite Analyse aller genetischen Loci und der Vergleich von SNPs in den Gesamtgenomen von *M. caprae* (STUCKI & GAGNEUX, 2013; ROETZER et al., 2013). Genomverwandtschaften zwischen *M.-caprae*-Spezies und vergleichend auch zu *M. bovis* und anderen MTC-Mitgliedern können genutzt werden, um Rückschlüsse auf die Richtung der Erregerübertragung, auf Virulenzfaktoren und generell Erkenntnisse über die Plastizität der Genome zu gewinnen, die für eine erfolgreiche Bekämpfung der Rindertuberkulose essentiell sind.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der WGS-Technologie eine *de-novo*-Genomsequenzierung (BAKER, 2012; EKBLÖM & WOLF, 2014) von *M.-caprae*-Isolaten durchzuführen und die Erstellung einer vollständigen und möglichst lückenlosen Gesamtgenomsequenz von

*M. caprae*, die als Referenz-Genomsequenz für zahlreiche zukünftige Tuberkulose-Analysen aus den unterschiedlichsten Bereichen der Genomics- und Proteomics-Forschung genutzt werden kann. Ferner sollte auf Grundlage des erstellten *M.-caprae*-Referenzgenoms die genetische Verwandtschaft in Form von SNPs von zahlreichen *M.-caprae*-Isolaten aus Rinderbetrieben, in denen mehrere Tiere *M.-caprae*-infiziert waren, untersucht werden. In dieser Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass absolut identische Genome in mehreren Rindern eines Betriebes vorkommen und dass sich die Genome der verschiedenen *M.-caprae*-Isolate eines Betriebes meist nur in einigen wenigen Nukleotiden (SNPs) unterscheiden. Dies spricht dafür, dass ein einziges *M.-caprae*-infiziertes Tier im jeweiligen Bestand für die Ansteckung aller anderen Tiere dieses Betriebs verantwortlich war. Ferner ist es gelungen, mit Hilfe des Illumina HiSeq 1500 Sequenzierungssystems das Genom von *M. caprae* vollständig zu sequenzieren und aus den ca. 250 bp langen Sequenzfragmenten der Illuminadaten ein zu ca. 99,9 % vollständiges Referenzgenom von *M. caprae* zu erstellen.

Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse der *M. caprae* SNP-Genomanalysen innerhalb von Rinderbetrieben zusammengefasst. Ferner sollen die Möglichkeiten und Grenzen der WGS-Anwendung und die SNP-Typisierung in der molekularen Epidemiologie und TB-Forschung diskutiert werden. Zudem wird die Bedeutung des erstmalig erstellten Referenzgenoms von *M. caprae* für weitere Untersuchungen in der Tuberkuloseforschung erörtert.

## 2 Technische und analytische Schwierigkeiten des WGS

Die Bestimmung der genetischen Abstände zwischen *M.-caprae*-Isolaten aus Rindern in dieser Arbeit beruht auf einem Abgleich der *M.-caprae*-Genome mit einem geeigneten Referenzgenom und der Ermittlung der genetischen Abweichungen (SNPs). Die Aussagekraft über die genetische Verwandtschaft der *M.-caprae*-Isolate hängt daher von der Verfügbarkeit eines für die SNP-Identifizierung passenden Vergleichsgenoms ab. Zunächst wurden die Berechnungen in Ermangelung einer *M.-caprae*-Gesamtgenomsequenz mit *M. tuberculosis* H37Rv durchgeführt. Jedoch aufgrund der abstammungsspezifisch hohen Anzahl an genetischen Unterschieden zwischen *M. caprae* und *M. tuberculosis* H37Rv eignet sich dieses als Referenzgenom nur bedingt (STUCKI et al., 2012; STUCKI & GAGNEUX, 2013). Ziel war es, ein optimales Referenzgenom für *M. caprae* zu erstellen. Die Sequenzierplattform des Illumina HiSeq 1500 liefert in kurzer Zeit große Mengen an 250 bp langen Sequenzen, die eine Genomabdeckung von mehreren hundertmal ermöglichen. Die

kurzen Sequenzen wurden zu einer ca. 99 %-vollständigen Genomsequenz zusammengesetzt. Jedoch stellen bestimmte Bereiche des Genoms aufgrund von „repetitiven“ Regionen, die mehrmals auf das Genom verteilt vorkommen, eine Schwierigkeit in der korrekten Zusammensetzung des Genoms dar. Diese „repetitiven“ Regionen sind durch einen hohen Gehalt an Prolin-Glutamat (PE) und Prolin-Prolin-Glutamat (PPE) Genfamilien gekennzeichnet und erschweren die Sequenzierung und das Genom-Assembly (BRYANT et al., 2013; COPIN et al., 2014; STUCKI et al., 2015). In *M. tuberculosis* werden diese beiden Proteinfamilien in Zusammenhang mit dem Prozess der Antigen-Variationen gebracht, welche durch Veränderung gewisser Proteinsequenzen einen Angriff des Wirtsimmunsystems inhibieren können und die wirtseigenen Antikörper nutzlos machen (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; BANU et al., 2002). Diese Proteinfamilien sind sehr wahrscheinlich essentiell für das Überleben des Erregers verantwortlich und nehmen erstaunliche 10 % der Kodierungskapazität des Erbguts in *M. tuberculosis* ein (COLE et al., 1998; MCEVOY et al., 2012). Ferner bieten diese Genfamilien (Proteine) mit ihren umfassenden Sequenzpolymorphismen eine Quelle an Variationen auf selektiven Druck (COLE et al., 1998). Etwa 10 % aller SNPs im Genom von *M. tuberculosis* entfallen auf diese repetitiven Regionen oder Insertionssequenzen, die ein potenzielles Übermaß an Vielfalt aufweisen (MCEVOY et al., 2012; COPIN et al., 2014). Daher kann die korrekte Abfolge dieser repetitiven Regionen im Genom oft nicht korrekt errechnet werden, auch bedingt durch die Sequenzier-Leselänge von 250 bp, die im Allgemeinen zu kurz ist, um repetitive Regionen oder Insertionssequenzen zu lesen (BRYANT et al., 2013; COPIN et al., 2014). Dadurch enthielt das *M.-caprae*-Referenzgenom an mehreren Stellen Lücken von unbestimmter Größe. Eine Schließung dieser sogenannten „Gaps“ kann durch eine korrekte Zuordnung der repetitiven Abschnitte erfolgen. Hierzu wurden an den Rändern zu den Genomlücken Primer-Sequenzen ermittelt, und PCR-Ansätze entwickelt, deren Amplifikate diese Lücken überspannen. Jedoch muss dies manuell durchgeführt werden und ist sehr zeitaufwändig mit der Folge eines langsamen Fortschritts. Als Alternative zu einem manuellen Schließen der Lücken wurde der Versuch einer Nanopore-Genomsequenzierung mit Hilfe eines sog. Minion von Oxford Nanopores unternommen (FENG et al., 2015; LAVER et al., 2015; WALTER et al., 2016). Im Gegensatz zu dem Verfahren von Illumina bestimmt dieses Gerät nicht nur einige hundert Basen, sondern kann bis in den Bereich von über 10-kBp lange Sequenzen im Stück erfassen (LOMAN et al., 2012 a; LU et al., 2016). Allerdings ist aktuell die Fehlerrate der Sequenzen wesentlich höher als beim Illumina-Verfahren. Auch gibt es für dieses sehr neue Verfahren kaum Programme, die eine spezifische Auswertung und Bearbeitung der

Sequenzdaten ermöglichen. Dennoch eignet sich die Nanoporen-Sequenzierung insbesondere dazu, die problematischen, sich wiederholenden Sequenzbereiche zu bestimmen (BATES et al., 2016) und idealerweise eine verbesserte bzw. vervollständige Berechnung der gesamten *M.-caprae*-Referenzgenom-Sequenz zu ermöglichen. Leider sind die Pionierversuche mit Hilfe der Nanoporen-Sequenzierung einige problematische Bereiche des Referenzgenoms korrekt zu sequenzieren, fehlgeschlagen. Als Ursache ist die kurze DNA-Fragment-Länge in Lösung, die aus den *M.-caprae*-Isolaten isoliert wurde, zu nennen. Dies kann auf die geforderte, thermische Erhitzung der Proben auf 95°C für 10 min nach der DNA-Isolierung zurückgeführt werden. Mykobakterien sind aufgrund ihres zoonotischen Potenzials in die Risikogruppe 3 eingeordnet (BioStoffV, 2013), und um eine Verschleppung lebensfähiger Mykobakterien zu vermeiden, ist eine thermische Behandlung aus Sicherheitsgründen erforderlich. Diese Erhitzung jedoch führt zur weitgehenden Zerstörung und zur Fragmentierung der DNA. Die Länge der verfügbaren DNA-Fragmente reicht nicht aus, die fehlenden Bereiche des Genoms zu bestimmen. Das *M.-caprae*-Referenzgenom wurde durch manuelles Schließen der Lücken fertiggestellt. Als geringfügige Limitierung ist anzumerken, dass es eine einzige Lücke unbekannter Größe enthält aufgrund der bereits beschriebenen repetitiven Region und deren genetischer Vielfalt. Um die zukünftige Sequenzierung dieser problematischen Regionen zu erleichtern, könnten längere Leselängen genutzt werden. Die Sequenzieretechnologie mit einer längeren Leselänge ist bereits verfügbar, jedoch für kleine prokaryontische Genome im Moment noch nicht kosteneffektiv genug (LOMAN et al., 2012a). Ferner würden längere Leselängen auch *in-silico*-MIRU-VNTR-Muster identifizieren, die zum Abgleich mit bereits bekannten MIRU-VNTR-Mustern genutzt werden könnten (RAGHEB et al., 2013). Jedoch wäre für die Sequenzierung und Extraktion mittels Software von MIRU-Mustern eine Leselänge von mindestens 500 bp notwendig, da jedes MIRU-Muster aus Wiederholungseinheiten mit Längen zwischen 51 bp und 111 bp besteht (SUPPLY et al., 2006).

### 3 SNP Analyse in *Mycobacterium-caprae*-Genomen aus Rinderbetrieben

WGS ist ein ideales Werkzeug zur Bereitstellung genomischer Informationen in der täglichen Grundlagen- und klinischen Forschung geworden. In dieser Arbeit werden zum ersten Mal, unter Verwendung von WGS-Daten, die Genome von *M.-caprae*-Isolaten aus ausgewählten Rinderbeständen im bayerischen Alpenraum untersucht. Die Genomvergleiche dieser *M.-caprae*-Isolate sollen genetische Veränderungen in Form von einzelnen Nukleotidänderungen, die als SNPs (single nucleotide polymorphisms) bezeichnet werden, im Genom der pathogenen Tuberkuloseerreger aufzeigen. Die Analyse der Genomdaten ermöglicht, sowohl einen bTB-Eintrag in den Rinderbetrieb, als auch die bTB-Ausbreitung innerhalb des Betriebs nachzuvollziehen (BIEK et al., 2012). Alle *M.-caprae*-Isolate, die aus Rindern isoliert wurden, die mit bTB-infiziert waren, weisen die SNPs des ursprünglichen Stammes auf, unabhängig von einer Ansteckung zwischen Rind und Rind oder mit einem Wirtswechsel zwischen Rind und Rotwild. Diese SNPs ermöglichen somit den Grad der genetischen Verwandtschaft der isolierten *M.-caprae*-Stämme zu ermitteln und auf eine mögliche Infektionskette schließen zu lassen. Eine geeignete Referenzsequenz ermöglicht genauere, speziesspezifische Berechnungen des genetischen Abstands von *M.-caprae*-Isolaten, und daher ist für die SNP-basierte Vergleichsanalyse die Wahl eines optimalen Referenzgenoms essentiell. Das *M.-caprae*-Genom (Publikation 2, Diskussion, Abschnitt 2) als Referenzgenom gilt allen bisher nutzbaren Speziesgenomen des MTC als überlegen und stellt die ideale Voraussetzung für einen Genomabgleich innerhalb der Spezies dar. Es wurden zwei unterschiedliche analytische Verfahren angewandt, um die bTB-Übertragung innerhalb der Betriebe und zwischen den einzelnen Betrieben darzustellen (MJ network-Analyse vs. Maximumlikelihood Phylogenetic Tree) (Publikation 2). Obwohl eine MJ network-Analyse insgesamt mehr Information über eine mögliche Transmission aufgrund der Darstellung einzelner SNPs liefert, konnten sehr ähnliche Ergebnisse mit dem Maximumlikelihood Tree erzielt werden. Beide Darstellungen zeigen, dass innerhalb jeden Betriebs eine eigene genetische Linie nachweisbar ist, und die Unterlinien können eindeutig auf die gleiche Abstammung im Betrieb zurückgeführt werden.



#### 4 „Who gave bTB to whom?“

Um eine Aussage über die Ausbreitungswege von *M. caprae* treffen zu können, wurde der genetische Abstand (SNPs) zwischen den Genomen der *M.-caprae*-Isolate aus Rindern und dem *M.-caprae*-Referenzgenom (Publikation 2) ermittelt. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die meisten *M.-caprae*-Isolate genetische Abstände von weniger als fünf Nukleotidunterschiede aufweisen, und es kann in diesen Fällen von einer direkten Übertragung zwischen den infizierten Tieren ausgegangen werden.

Der SNP-Vergleich von Genomen der *M.-caprae*-Isolate, die nicht aus ein und demselben Betrieb stammten, zeigen generell wesentlich mehr SNP-Unterschiede. Daher kann aus den Ergebnissen dieser Studie eine Rind-zu-Rind-Ansteckung innerhalb des jeweiligen Betriebs als der dominierende bTB-verursachende Faktor angesehen werden. Die Ergebnisse der Sequenzdaten und deren Darstellung im phylogenetischen Netzwerk weisen darauf hin, dass je ein Tier die Ansteckung aller anderen infizierten Tiere in einem der acht Untersuchungsbetriebe verursacht hat.

Die meisten der bisher durchgeführten Studien zu TB-Ausbrüchen mit Hilfe von WGS haben die Existenz einer Quelle mit hoher Ausscheidungsrate, sogenannte „Super Spreader“, beschrieben, von der aus ein sternförmiges Weiterverbreitungsmuster ausgeht (GARDY et al., 2011; ROETZER et al., 2013; WALKER et al., 2013 a). Der Nachweis des „Super Spreader“-Phänomens wurde erstmals durch eine Sozialkontakt-Rückverfolgung eines TB-Ausbruchs beim Menschen erbracht (MCELROY et al., 2003). Ähnliches konnte mit den klassischen molekularen Methoden in der epidemiologischen Nachforschung bisher nicht nachgewiesen werden (WALKER et al., 2013a). Die sternförmige Ausbreitungsdarstellung, die das Ausbruchsszenario innerhalb der meisten Betriebe dieser Studie darstellt, weist auf die Existenz eines „Super Spreader“ hin und zeigt seine Präsenz realistischer als bisher angenommen (PEREZ-LAGO et al., 2014; WALKER et al., 2013 a). Die Ansteckungsgefahr, die von einem hoch-Risikotier („Super Spreader“) ausgeht, ist für alle anderen Tiere eines Betriebes sowie für eine zoonotische Ansteckung erheblich. Die Identifizierung eines „Super-Spreader“ ist daher wichtig, kann jedoch in einem Rinderbetrieb kaum umgesetzt werden und veranschaulicht daher die Notwendigkeit einer kompletten Stallräumung, wie sie bei bTB-Ausbrüchen praktiziert werden sollte. Neben dem Ziel, eine bTB-Ausbreitung durch Keulung zu kontrollieren, werden Bestandsimpfungen empfohlen und würden die besten Auswirkungen auf die bTB-Ausbreitung haben (BROOKS-POLLOCK et al., 2014). Jedoch schreitet die bTB-Impfstoffforschung und -Entwicklung aufgrund der eher geringen

Investitionsrendite, im Vergleich zu den erheblichen Kosten, sehr langsam fort (KAUFMANN et al., 2010; COSTA et al., 2017). Ferner zielen die Impfstoffe entweder darauf ab, den bisherigen BCG-Impfstoff zu ersetzen oder die durch BCG-induzierte labile Immunität zu verstärken (CARPENTER et al., 2015). Allerdings ermöglichen diese Impfungen nur den Schutz vor einer möglichen Infektion, können aber weder den Erreger beseitigen, noch verhindern, dass sich eine chronische Infektion manifestiert (ANDERSEN & KAUFMANN, 2014). Man muss sich vor Augen halten, dass, wenn mehr als ein in diagnostischen Verfahren (z.B. Simultantest) sicher-positives Rind (Reagent) in einem Betrieb identifiziert werden kann, sich die Infektionsquelle höchstwahrscheinlich innerhalb des Betriebes befindet (GOODCHILD & CLIFTON-HADLEY, 2001).

## 5 Voraussetzungen und Grenzen der SNP-Analyse

Für einen aussagekräftigen Genomvergleich mit einer SNP Analyse muss ein gleicher Ausgangspunkt als Basis für alle Isolate geschaffen werden. Aus diesem Grund wurde von allen *M.-caprae*-Isolaten dieselbe Anzahl an Subkulturen angelegt, und die Anzucht erfolgte unter identischen Bedingungen (JAMES et al., 2000).

In vielen Fällen scheint der Zeitraum zwischen der Infektion und der Manifestation sehr kurz zu sein und lässt eine rasche Evolution von *M.-caprae*-Stämmen annehmen (Figure 2 und Supplementary Table 1 in Publikation 2). Hingegen zeigen generell alle *M.-caprae*-Genome aus einem Betrieb sehr wenige SNP-Unterschiede und lassen eine gemeinsame Infektionsquelle annehmen. Ferner lassen die geringen SNP Unterschiede auf eine fortlaufende, aber langsam fortschreitende Evolution schließen. Hierzu wurde in zwei Studien die Mutationsrate von *M. tuberculosis*, bei der sich einzelne SNPs innerhalb eines Genoms bilden und eine zeitabhängige Verwandtschaft abzuleiten erlauben, beschrieben (WALKER et al., 2013 a; FORD et al., 2011). Beide Studien schätzten, dass das Genom von *M. tuberculosis* mit einer durchschnittlichen Mutationsrate von einem SNP pro alle 2 Jahre mutiert. Zwar gibt es Hinweise auf eine Rekombination zwischen *M. tuberculosis* und anderen Spezies (NAMOUCHI et al., 2012), jedoch auf mikroevolutionärem Niveau kann *M. tuberculosis* immer noch als ein weitgehend klonaler Organismus angesehen werden (HIRSH et al., 2004; LIU et al., 2006). Es gibt allerdings Hinweise, dass im Menschen die mykobakterielle Population heterogen, aufgrund der fortlaufenden Mikroevolution im Wirt auftreten kann (PEREZ-LAGO et al., 2014; STUCKI et al., 2015). Sollte dies auch auf das Rind zutreffen, können die Ergebnisse bei der Identifizierung eines direkten Erregeraustausches von Rind-zu-

Rind beeinflusst werden, vor allem, wenn der Zeitraum zwischen Wirtsinfektion und Erregerisolierung unbekannt ist. Ferner erfolgte die Anzucht und Kultivierung aller untersuchten *M. caprae*-Isolate auf Nährmedium und letztendlich wurde eine einzige Kolonie pro Isolat für die Bestimmung der genetischen Vielfalt von *M. caprae* verwendet. Es ist derzeit noch unbekannt, ob in infiziertem Gewebe möglicherweise genetisch verschiedene *M. caprae* vorgefunden werden. In diesem Falle wäre die Anzahl an SNPs bei einer Erregergenom-Sequenzierung direkt aus dem Probenmaterial größer, als wie sie beim Menschen beschrieben wurde (WALKER et al., 2013 a; FORD et al., 2011). Hierzu wäre eine Anreicherung genomischer DNA von *M. caprae* aus infiziertem Gewebe (z.B. Lymphknoten) erforderlich, um ein Sequenzieren ohne Kultivierung zu ermöglichen (CARPENTER et al., 2013). Ein SNP-Abgleich könnte die Aussage erlauben, ob die Bakterien im infizierten Gewebe genetisch einheitlich vorkommen oder nicht.

Mit Ausnahme der konvergenten Evolution (oder „Homoplasie“), die in Mykobakterien selten auftritt und weitgehend auf genomische Regionen unter signifikantem Selektionsdruck in Form von antimikrobiellen Wirkstoffen beschränkt ist (CASALI et al., 2012; COMAS et al., 2013), kann die SNP-Analyse als hervorragendes Werkzeug für die Epidemiologie verwendet werden. Vorteilhaft sind dabei, dass im mykobakteriellen Genom Mutationen zielgerichtet und selten rückgängig sind (NAMOUCHI et al., 2012; COMAS et al., 2013), daher kann eine Übertragungskette anhand des SNP-Musters für jedes einzelne *M. caprae*-Isolat abgeleitet werden (PEREZ-LAGO et al., 2014).

Die WGS-Daten bieten daher ein Potenzial für mögliche Kontaktuntersuchungen und als Indikator die Richtung der Übertragung in einem Ausbruchgeschehen aufzuzeigen (WALKER et al., 2013 b). Der erste Beweis für dieses Prinzip wurde von Schürch et al. vorgestellt, der eine schrittweise Akkumulation von SNPs zwischen Patienten in einer gut charakterisierten Übertragungskette von *M. tuberculosis* zeigte (SCHURCH et al., 2010). Darüber hinaus zeigte Walker et al., wie in einem phylogenetischen Baum mit der Existenz einer gemeinsamen Quelle ein „Super-Spreader“ identifiziert werden kann (WALKER et al., 2013a). Zur genauen Rekonstruktion eines Übertragungsnetzes ist nicht nur ein Minimum an eng verwandten Genomen, sondern auch nicht-identische Genomsequenzen erforderlich (WALKER et al., 2013 b). Nachdem nur wenig Information zu Rinder-Bewegungen in Form von Handel oder von Almbesuchen verfügbar war, können die Ergebnisse unzureichend sein. Es müssen auch, unter Umständen wiederholte, externe bTB-Einträge bei der Interpretation der Ergebnisse aus den Betrieben und der Annahme, dass Einzel-Übertragungen für die

Aufrechterhaltung einer bTB-Infektion in den Betrieben verantwortlich sind, berücksichtigt werden. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten einer bTB-Einschleppung in einen Betrieb. Dazu gehören z.B. die Wiedereinführung der gleichen Abstammungs-Linie aus benachbarten Herden durch Handel oder die Einschleppung externer Bakterienpopulationen über Almbeweidung oder Futter, was durch die Persistenz von Mykobakterien in der Umwelt begünstigt wird. Der bereits erwähnte Erregeraustausch durch Infektionen zwischen artfremden Wirtspopulationen (Rotwild), muss ebenso berücksichtigt werden (FINK et al., 2015). Für eine bTB-Zirkulation innerhalb eines Betriebes sind zahlreiche Faktoren zu nennen. Jedoch kann die Infektionsquelle, die die anfängliche Dynamik und Ausbreitung antreibt, prinzipiell unterschieden werden in a) Externe Quelle, die zu einer bTB-Einschleppung bzw. Wiedereinschleppung geführt hat und b) Quellen, die im Betrieb selbst verankert sind (GOODCHILD & CLIFTON-HADLEY, 2001).

## 6 *Mycobacterium-caprae*-Epidemiologie

Wie schon in Diskussion 1 erwähnt, ist es unumstritten, dass Rinderbewegungen im Zusammenhang mit Tierhandel ein großes Risiko für eine Rind-zu-Rind Übertragung darstellen. Eine Tierhandel-assoziierte-*M. bovis*-Übertragung wurde bereits bei bTB-Fällen in Großbritannien (GILBERT et al., 2005; JOHNSTON et al., 2005) oder Frankreich (PALISSON et al., 2016) beschrieben. Auch das Auftreten des Allgäu-RD4-Subtypen im Tiroler Zillertal (Diskussion, Publikation 1) konnte auf Rinderhandel zurückgeführt werden. Die Eingliederung eines Tieres in einen Bestand oder in eine Herde ist immer mit einem potenziellen Risiko eines bTB-Erregeraustausches verbunden. Längst noch nicht abschließend geklärt sind die Ausscheidungswege und damit verbundene Ansteckung weiterer Tiere im Betrieb. Zum Kontakt zwischen Rindern aus unterschiedlichen Betrieben, aber auch zu anderen Wirten kommt es hauptsächlich auch während der Sömmerung auf der Alp/Alm. Eine bTB-Übertragung aufgrund räumlicher und zeitlicher Bewegung konnte in dieser Arbeit bei einem Kontakttier zu Betrieb 5 nachgewiesen werden (Figure 3 in Publikation 2). Experimentelle Studien zeigen, dass eine bTB-Übertragung indirekt auf Weiden möglich ist (SCHELLNER, 1956; PHILLIPS et al., 2003), und in diesem Zusammenhang konnte erst vor kurzem in Großbritannien die Rolle einer kontaminierten Umwelt auf die bTB-Übertragung gezeigt werden. Eine Reihe von Faktoren beeinflussen eine bTB-Übertragung über die Umwelt, wie beispielsweise die infektiöse Belastung von *M. bovis* in/im Fäkalien/Urin; eine temporäre Veränderung des Reservoirs, die Nähe zu Rinderweiden, die Art und Häufigkeit des Kontakts von Rindern mit Dachs-Exkrementen, sowie der Zustand der Fäkalproben

konnte genannt werden (KING et al., 2015). Für die bTB-Übertragung auf alpinen Weiden muss die Chronizität von *M.-caprae*-Infektionen in Rinderbetrieben und die hohe Mykobakterien-Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen mitberücksichtigt werden. Vor allem die Identifizierung des Rotwilds (*Cervus elaphus*) als Wildtierreservoir für *M. caprae* im Alpenraum (FINK et al., 2015) erschwert die bTB-Situation im Alpenraum zusätzlich. In dieser Arbeit konnte aufgrund der SNPs in den *M.-caprae*-Genomen eine bTB-Infektion von einem externen derzeit noch unbekannten Wirt gezeigt und eine mögliche Übertragung im Zusammenhang mit der Sömmierung von Rindern auf der Alp gebracht werden (Figure 3 und Supplementary Table S1 in Publikation 2). Die genaue Übertragungskette und der Erregeraustausch zwischen Rind und Rotwild sind derzeit noch ungelöst, wobei nach einer erfolgreichen Auswertung der an die 300 *M.-caprae*-Genomsequenzen sicher mehr Informationen verfügbar sind. Sobald ein infiziertes und TB-ausscheidendes Tier in ein und derselben epidemiologischen Gruppe präsent ist, ist ein direkter oder indirekter Kontakt für eine mykobakterielle Infektion nur noch zweitrangig (GOODCHILD & CLIFTON-HADLEY, 2001).

## 7 Ausblick

Die Gesamtgenomsequenzierung ist die exakteste Methode bei der Suche nach Mutationen oder Sequenzpolymorphismen durch direkte Bestimmung der Basenfolge. Deletionen sind leicht erkennbare und sehr stabile Genomcharakteristika, die über das gesamte Genom verteilt vorkommen und erst nach WGS-Analysen erkennbar werden. Durch die Verfügbarkeit immer leistungsfähigerer Sequenziersysteme und einer zunehmenden Automatisierung ist die Sequenzierung zudem einfacher und schneller geworden, jedoch ist eine routinemäßige Sequenzierung und molekulare SNP-Typisierung *aller* Isolate bislang sowohl technisch als auch finanziell nicht machbar. Daher sind weitere Innovationen nötig, um kleinere und robustere Sequenziersysteme zu entwickeln, die auch in Ländern mit einem enormen TB-Aufkommen Verwendung finden können und nicht Speziallabore und Personal voraussetzen. Ferner ist auch eine weitere Abnahme der Sequenzierkosten nötig. Der Ausbau der Nanopore-Sequenzierung ist hierbei ein wichtiger Schritt (STEIN, 2015; FENG et al., 2015; LU et al., 2016). Vor kurzem wurden auch kleine mobile Geräte vorgestellt, die ein flexibleres und kostengünstigeres Sequenzieren von kleinen Genomen erlauben (LOMAN et al., 2012 b). Auch die Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken muss vereinfacht werden. Hierzu wurden von Sackmann et al. sogenannte „lab-on-a-chip“-Geräte vorgestellt (SACKMANN et al., 2014). Natürlich wäre aber für zukünftige Studien besonders wünschenswert, wenn ein WGS direkt aus Erregergenomen *ex-vivo* in Se- und Exkreten durchgeführt werden könnte, um die genetische Vielfalt innerhalb des Wirtes zu untersuchen (SSENGOOBA et al., 2016), im Idealfall durch eine Sequenzierung von Einzelgenomen (LASKEN, 2012; BLAINEY, 2013; GOLE et al., 2013). Letztlich sind Verbesserungen und Neuentwicklungen im Bereich der Sequenzauswerteprogramme wünschenswert, damit die Bioinformatik einer größeren Anwendergruppe zugänglich gemacht werden kann.

Aufgrund der WGS-Daten können epidemiologische Zusammenhänge besser verstanden werden, die mit den klassischen Methoden der Genotypisierung nicht möglich sind, und darüber hinaus erlauben sie uns einen Einblick in die genomische Vielfalt und Anpassungsfähigkeit des pathogenen Erregers. Um eine endgültig Aussage über die Richtung der Infektionsübertragung von *M. caprae* zwischen Rind und Rotwild in der Alpenregion treffen zu können und die ursprüngliche Infektionsquelle zu identifizieren, muss die bioinformatische Auswertung der bisher sequenzierten ca. 300 *M.-caprae*-Stämme abgewartet werden. Anhand der SNPs wird eine Analyse der genetischen Verwandtschaft der Isolate möglich sein und Übertragungswege von *M. caprae* aufgezeigt werden können.



## V ZUSAMMENFASSUNG

Die Rindertuberkulose stellt auch heute noch ein weltweit vorkommendes Problem dar, und zunehmende Fälle von *Mykobakterium-caprae*-Infektionen bei Rindern und Rotwild im bayerischen und österreichischen Alpenraum gaben Anlass zu umfangreichen diagnostischen und molekular-epidemiologischen Untersuchungen. Über das Genom von *M. caprae* gibt es nur wenig Informationen, nachdem dieser Erreger erst im Jahr 2003 als eigenständige Spezies im *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC) definiert wurde.

An Hand erster Gesamtgenom-Sequenzdaten alpiner *M.-caprae*-Isolate konnte in einer diagnostisch-epidemiologisch fokussierten Publikation der Genomabschnitt mit der Unterscheidungs-Region 4 (Region of Difference 4, RD4) als robustes Differenzierungskriterium für *M.-caprae*-Subtypen gezeigt werden. Dazu wurde ein Multiplex-PCR-Ansatz entwickelt, mit dem schnell und einfach *M.-caprae*-Isolate (vorwiegend aus Rind und Rotwild) in drei Subtypen unterschieden werden können und der ihre Herkunft geographisch abgrenzbar macht.

In einer zweiten Veröffentlichung wurde erstmalig eine weltweit nutzbare Referenzgenom-Sequenz von *M. caprae* aus Genomen von Rindertuberkulosefällen im bayerischen Alpenraum für die Datenbank verfügbar gemacht. Mit Hilfe dieser optimalen Referenz-Genomsequenz wurden die Gesamtgenomsequenzen von über 300 *M.-caprae*-Isolaten aus Mensch, Rind und Rotwild erstellt, korrekt angeordnet und für Vergleichsanalysen aufbereitet. Über die Identifizierung von Deletionen, vorrangig in und um die RD4-Region konnten bislang sieben verschiedene genetische Variationen in den *M.-caprae*-Isolaten identifiziert werden. Erstaunlicherweise zeigen alle sieben RD4-Variationen eine genetische Stabilität und deuten auf die geographische Herkunft der *M.-caprae*-Isolate hin. Die genomweite Analyse einzelner Nukleotidpolymorphismen (SNPs) wurde als Diversitätsmarker für ein phylogenetisches Netzwerk mit acht bTB-betroffenen Rinderbetrieben aus insgesamt 61-Genomsequenzen von *M.-caprae*-Isolaten über einen Zeitraum von zwölf Jahren, zwischen 2004 und 2015, genutzt. Die meisten *M.-caprae*-Isolate aus einem Betrieb zeigten genetische Abstände von weniger als fünf Nukleotidunterschiede und in den meisten Betrieben gab es Isolate von drei oder mehr Tieren mit absolut identischen Genomen. Die *M.-caprae*-Genome aus den Isolaten verschiedener Betriebe hatten deutlich mehr SNP-Unterschiede zueinander, womit ein externer Eintrag durch betriebsfremde Tiere

eindeutig nachweisbar ist. Die inner-betriebliche Interaktion der Tiere kann als dominanter bTB-Infektionsverursachender Faktor angesehen werden, wobei ein oder mehrere stark Bakterien-ausscheidende Tiere („Super Spreader“) eine große Rolle spielen dürften. Eine *M. caprae*-Infektion durch räumliche und zeitliche Sömmerung auf alpinen Weiden konnte zudem nachgewiesen werden.

## VI SUMMARY

Bovine tuberculosis (bTB) is still a global problem and an increase of *Mycobacterium caprae* infections in cattle and red deer in Bavarian and Austrian Alpine regions lead to intensified diagnostics and molecular epidemiology. There is only sparse information about the genome of *M. caprae* since this pathogen of the *Mycobacterium-tuberculosis*-Complex (MTC) has definitely been defined as a unique species not earlier than 2003. Based on first data from whole genome sequencing the genomic region of difference four (RD4) was used to demonstrate robust molecular identification of *M. caprae* subtypes useful in diagnostics and molecular epidemiology. In this context a multiplex PCR was developed for rapid and easy differentiation of the subtypes and the geographical allocation of new isolates, predominantly from cattle and red deer. In a following project a complete reference genome of *M. caprae* derived from genomes of cattle isolates in the Bavarian Alps was constructed and provided for gene bank for worldwide usage. Based on this optimized reference genome as a template nearly 300 genomes of *M. caprae* isolates from man, cattle and red deer were sequenced, correctly assembled and used for comparative analysis. So far the discoverage of genome-wide deletions preferably in and around the RD4 region allowed the definition of seven genetic variants showing stability and again can be allocated to geographically defined regions. In addition genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was used as diversity marker to establish a phylogenetic network for eight bTB affected cattle holdings (with 61 complete genome sequences from *M. caprae* isolates) in a time frame from 2004 to 2015. Most of the genomes of *M. caprae* isolates within a holding showed a maximum of five SNPs difference and in the majority of the holdings the isolates from three or even more animals had identical genomes. In contrast isolates from different holdings showed a much higher SNP diversity to each other that clearly allowed to identify an external introduction of *M. caprae* in a holding. The interaction of cattle within a holding can be defined as the most likely source for spread of infection and the existence of one or more so called “super spreader” animals shedding lots of bacteria can be assumed. Furthermore, a cattle infection and transmission was shown due to spatial and temporal movement of alpine pasture summering.

## VII LITERATURVERZEICHNIS

- Abadia E, Zhang J, dos Vultos T, Ritacco V, Kremer K, Aktas E, Matsumoto T, Refregier G, van Soolingen D, Gicquel B, Sola C. Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infection, genetics and evolution journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2010; 10(7): 1066–1074.
- Abdallah AM, Gey van Pittius, Nicolaas C, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls, Christina M J E, Appelmelk BJ, Bitter W. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nature reviews. Microbiology* 2007; 5(11): 883–891.
- Abernethy DA, Denny GO, Menzies FD, McGuckian P, Honhold N, Roberts AR. The Northern Ireland programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis* 2006; 112(2-4): 231–237.
- Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual review of microbiology* 2008; 62: 53–70.
- Achtman M. How old are bacterial pathogens? *Proceedings. Biological sciences* 2016; 283(1836).
- AGES. Bericht über Zoonosen und ihre Erreger in Österreich im Jahr 2014 / Report on Zoonoses and Zoonotic Agents in Austria, 2014 2014.
- AGES. Veterinärjahresbericht 2014 / Annual Veterinary Report 2014 / 2015.
- AGES. Stellungnahme – Risikobewertung von Milcherzeugnissen und Roh (Wild-) Fleischerzeugnissen bei Verdacht auf Tuberkulose. 2016.
- Aime B, Lequen L, Balageas A, Haddad N, Maugein J. *M. bovis* and *M. caprae* infections in Aquitaine: A clinico-epidemiologic study of 15 patients. *Pathologie Biologie* 2012; 60(3): 156–159.
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius, Nicolaas C. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases* 2010; 16(8): 1296–1299.

- Alix E, Godreuil S, Blanc-Potard A-B. Identification of a Haarlem genotype-specific single nucleotide polymorphism in the *mgtC* virulence gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44(6): 2093–2098.
- Alland D, Lacher DW, Hazbon MH, Motiwala AS, Qi W, Fleischmann RD, Whittam TS. Role of large sequence polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the utility of LSPs in phylogenetic analysis. *Journal of clinical microbiology* 2007; 45(1): 39–46.
- Allard MW. The Future of Whole-Genome Sequencing for Public Health and the Clinic. *Journal of clinical microbiology* 2016; 54(8): 1946–1948.
- Allen BW, Mitchison DA. Counts of viable tubercle bacilli in sputum related to smear and culture gradings. *Medical laboratory sciences* 1992; 49(2): 94–98.
- Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004; 39(6): 783–789.
- Al-Thwani AN, Al-Mashhadani MS. Tuberculosis in slaughtered cattle and workers in some abattoirs of Baghdad governorate. *International journal of mycobacteriology* 2016; 5 Suppl 1: S250-S251.
- Amann-Vesti BR. *Klinische Pathophysiologie*: Georg Thieme Verlag; 2006.
- Amato B, Mignacca SA, Pacciarini ML, Vitale M, Antoci S, Cucinotta S, Puleio R, Biasibetti E, Fiasconaro M, Capucchio MT, Lo Marco Presti V. An outbreak of bovine tuberculosis in a fallow deer herd (*Dama dama*) in Sicily. *Research in veterinary science* 2016; 106: 116–120.
- Ameni G, Vordermeier M, Aseffa A, Young DB, Hewinson RG. Field Evaluation of the Efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin against Bovine Tuberculosis in Neonatal Calves in Ethiopia. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17(10): 1533–1538.
- Ancelet LR. The protective CD4<sup>+</sup> memory T cell response to tuberculosis. University of Otago 2013.

- Andersen P, Kaufmann SH. Novel vaccination strategies against tuberculosis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2014; 4(6).
- Andersen P, Smedegaard B. CD4<sup>+</sup> T-Cell Subsets That Mediate Immunological Memory to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. Infection and Immunity 2000; 68(2): 621–629.
- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2003; 53(Pt 6): 1785–1789.
- Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Dominguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. International journal of systematic bacteriology 1999; 49 Pt 3: 1263–1273.
- Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, van Embden JD, Cousins D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. Journal of clinical microbiology 1996; 34(11): 2734–2740.
- Argyrou A, Vetting MW, Blanchard JS. Characterization of a new member of the flavoprotein disulfide reductase family of enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of biological chemistry 2004; 279(50): 52694–52702.
- Arlehamn CSL, Sidney J, Henderson R, Greenbaum JA, James EA, Moutaftsi M, Coler R, McKinney DM, Park D, Taplitz R, Kwok WW, Grey H, Peters B, Sette A. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c (EsxJ). Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950) 2012; 188(10): 5020–5031.
- Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. Clinical microbiology



- and infection the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2005; 11(2): 122–130.
- Asgharzadeh M, Samadi KH, Pourostadi M, Asadi FN, Rashedi J, Mahdavi pour B. Strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for epidemiology in northwest of Iran. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France) 2016; 62(8): 15–20.
- Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 2004; 8(8): 924–937.
- Baker M. De novo genome assembly: what every biologist should know. Nature Methods 2012; 9(4): 333–337.
- Banu S, Honoré N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prévost M, Cole ST. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? Molecular microbiology 2002; 44(1): 9–19.
- Barbier E, Boschirolì ML, Gueneau E, Rochelet M, Payne A, Cruz K de, Bliex AL, Fossot C, Hartmann A. First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis. Journal of applied microbiology 2016; 120(5): 1193–1207.
- Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. The New England journal of medicine 2003; 349(12): 1149–1156.
- Bass KE, Nonnecke BJ, Palmer MV, Thacker TC, Hardegger R, Schroeder B, Raeber AJ, Waters WR. Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. Clinical and vaccine immunology 2013; 20(12): 1827–1835.
- Bates M, Polepole P, Kapata N, Loose M, O'Grady J. Application of highly portable MinION nanopore sequencing technology for the monitoring of nosocomial tuberculosis infection. Supplement: The 2nd Asian-African Congress of International Journal of Mycobacteriology, Iran 2016; 5, Supplement 1: S24.

- Bayley H. Nanopore sequencing: from imagination to reality. *Clinical chemistry* 2015; 61(1): 25–31.
- Beer J. *Infektionskrankheiten der Haustiere*, 2nd ed. Jena: Fischer-Verlag; 1980.
- Behr MA. Comparative genomics of BCG vaccines. *Tuberculosis* 2001; 81(1-2): 165–168.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)* 1999; 284(5419): 1520–1523.
- Benavides-Nieto M, Olbrich P, Obando-Santaella I, Falcon-Neyra L, Neth O, Gonzalez-Galan V, Luque R. Congenital Tuberculosis Due to Confirmed *Mycobacterium caprae*. *The Pediatric infectious disease journal* 2016; 35(11): 1278–1279.
- Benjak A, Sala C, Hartkoorn RC. Whole-Genome Sequencing for Comparative Genomics and De Novo Genome Assembly 2015; 1285: 1–16.
- Bentley DR. Whole-genome re-sequencing. *Genomes and evolution* 2006; 16(6): 545–552.
- Bercovier H, Kafri O, Sela S. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1986; 136(3): 1136–1141.
- Berentsen AR, Dunbar MR, Johnson SR, Robbe-Austerman S, Martinez L, Jones RL. Active use of coyotes (*Canis latrans*) to detect Bovine Tuberculosis in northeastern Michigan, USA. *Special issue: 5th International Conference on Mycobacterium bovis* 2011; 151(1–2): 126–132.
- Berg S, Firdessa R, Habtamu M, Gadisa E, Mengistu A, Yamuah L, Ameni G, Vordermeier M, Robertson BD, Smith NH, Engers H, Young D, Hewinson RG, Aseffa A, Gordon SV. The burden of mycobacterial disease in ethiopian cattle: implications for public health. *PloS one* 2009; 4(4): e5068.
- Bergval IL, Vijzelaar RNCP, Dalla Costa ER, Schuitema ARJ, Oskam L, Kritski AL, Klatser PR, Anthony RM. Development of multiplex assay for rapid characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(2): 689–699.

- Bermingham ML, More SJ, Good M, Cromie AR, Higgins IM, Brotherstone S, Berry DP. Genetics of tuberculosis in Irish Holstein-Friesian dairy herds. *Journal of dairy science* 2009; 92(7): 3447–3456.
- Bezoz J, Juan L de, Romero B, Alvarez J, Mazzucchelli F, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Veterinary immunology and immunopathology* 2010; 133(2-4): 269–275.
- BfR. Stellungnahme: Risikobewertung - Fragen und Antworten zur Rindertuberkulose 2013. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zur-rindertuberkulose.pdf>.
- Biek R, O'Hare A, Wright D, Mallon T, McCormick C, Orton RJ, McDowell S, Trewby H, Skuce RA, Kao RR. Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of *Mycobacterium bovis* in sympatric cattle and badger populations. *PLoS pathogens* 2012; 8(11): e1003008.
- Biet F, Boschirolu ML, Thorel MF, La Guilloteau. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Veterinary research* 2005; 36(3): 411–436.
- BioStoffV. Biostoffverordnung - Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen 2013. [https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/biostoffv\\_2013/gesamt.pdf](https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/biostoffv_2013/gesamt.pdf).
- Blaas SH, Bohm S, Martin G, Erler W, Gluck T, Lehn N, Naumann L. Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae* infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2003; 47(2): 431–433.
- Blainey PC. The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS microbiology reviews* 2013; 37(3): 407–427.
- Blander JM, Medzhitov R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nature immunology* 2006; 7(10): 1029–1035.
- Boniotti MB, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, Tisato E, Zanoni M, Zoppi S, Dondo A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini ML. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of

- variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *Journal of clinical microbiology* 2009; 47(3): 636–644.
- Boritsch EC, Supply P, Honore N, Seemann T, Stinear TP, Brosch R. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Molecular microbiology* 2014; 93(5): 835–852.
- Bouakaze C, Keyser C, Gonzalez A, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, Jaulhac B, Ludes B. MALDI-TOF MS-based SNP genotyping assay using the iPLEX Gold technology for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species and lineages. *J. Clin. Microbiol.* 2011a: JCM.00744-11.
- Bouakaze C, Keyser C, Gonzalez A, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, Jaulhac B, Ludes B. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay Using iPLEX Gold Technology for Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Species and Lineages. *J. Clin. Microbiol.* 2011b; 49(9): 3292–3299.
- Bouakaze C, Keyser C, Martino SJ de, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, Ludes B. Identification and Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Species by Use of a SNaPshot Minisequencing-Based Assay<sup>▽</sup>. *Journal of clinical microbiology* 2010; 48(5): 1758–1766.
- Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry* 1995; 64: 29–63.
- Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2001; 5(5): 462–467.
- Brook RK, Wal EV, van Beest FM, McLachlan SM. Evaluating use of cattle winter feeding areas by elk and white-tailed deer: implications for managing bovine tuberculosis transmission risk from the ground up. *Preventive veterinary medicine* 2013; 108(2-3): 137–147.
- Brooks-Pollock E, Roberts GO, Keeling MJ. A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. *Nature* 2014; 511(7508): 228–231.

- Brosch R, Gordon SV, Buchrieser C, Pym AS, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast* (Chichester, England) 2000; 17(2): 111–123.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos SS, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104(13): 5596–5601.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99(6): 3684–3689.
- Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in microbiology* 2001; 9(9): 452–458.
- Brotherstone S, White IMS, Coffey M, Downs SH, Mitchell AP, Clifton-Hadley RS, More SJ, Good M, Woolliams JA. Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *Journal of dairy science* 2010; 93(3): 1234–1242.
- Broughan JM, Judge J, Ely E, Delahay RJ, Wilson G, Clifton-Hadley RS, Goodchild AV, Bishop H, Parry JE, Downs SH. A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. *Epidemiology and infection* 2016; 144(14): 2899–2926.
- Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris, SR, Beer JL de, Jager V de, Kremer K, van Hijum SA, Siezen RJ, Borgdorff M, Bentley SD, Parkhill J, van Soolingen D. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC infectious diseases* 2013; 13: 110.
- Buss BF, Keyser-Metobo A, Rother J, Holtz L, Gall K, Jereb J, Murphy CN, Iwen PC, Robbe-Austerman S, Holcomb MA, Infield P. Possible Airborne Person-to-Person Transmission of *Mycobacterium bovis* - Nebraska 2014-2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 2016; 65(8): 197–201.

- Cabal A, Strunk M, Domínguez J, Lezcano MA, Vitoria MA, Ferrero M, Martín C, Iglesias MJ, Samper S. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis used for the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on a pyrosequencing assay. BMC Microbiology 2014; 14(1): 1.
- Cao G, Howard ST, Zhang P, Wang X, Chen XL, Samten B, Pang X. EspR, a regulator of the ESX-1 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*, is directly regulated by the two-component systems MprAB and PhoPR. Microbiology (Reading, England) 2015; 161(Pt 3): 477–489.
- Carpenter C, Sidney J, Kolla R, Nayak K, Tomiyama H, Tomiyama C, Padilla OA, Rozot V, Ahamed SF, Ponte C, Rolla V, Antas PR, Chandele A, Kenneth J, Laxmi S, Makgotlho E, Vanini V, Ippolito G, Kazanova AS, Panteleev AV, Hanekom W, Mayanja-Kizza H, Lewinsohn D, Saito M, McElrath MJ, Boom WH, Goletti D, Gilman R, Lyadova, IV, Scriba TJ, Kallas EG, Murali-Krishna K, Sette A, Lindestam ACS. A side-by-side comparison of T cell reactivity to fifty-nine *Mycobacterium tuberculosis* antigens in diverse populations from five continents. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland) 2015; 95(6): 713–721.
- Carpenter ML, Buenrostro JD, Valdiosera C, Schroeder H, Allentoft ME, Sikora M, Rasmussen M, Gravel S, Guillen S, Nekhrizov G, Leshtakov K, Dimitrova D, Theodossiev N, Pettener D, Luiselli D, Sandoval K, Moreno-Estrada A, Li Y, Wang J, Gilbert MTP, Willerslev E, Greenleaf WJ, Bustamante CD. Pulling out the 1%: whole-genome capture for the targeted enrichment of ancient DNA sequencing libraries. American journal of human genetics 2013; 93(5): 852–864.
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Corander J, Bryant J, Parkhill J, Nejentsev S, Horstmann RD, Brown T, Drobniowski F. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. Nature genetics 2014; 46(3): 279–286.
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR, Bentley SD, Parkhill J, Nejentsev S, Hoffner SE, Horstmann RD, Brown T, Drobniowski F. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. Genome research 2012; 22(4): 735–745.



- Chambers MA, Carter SP, Wilson GJ, Jones G, Brown E, Hewinson RG, Vordermeier M. Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: an overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. *Veterinary Record* 2014; 175(4): 90–96.
- Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infection and Immunity* 1991; 59(5): 1755–1761.
- Che D, Bitar D, Desenclos JC. Epidemiology of tuberculosis in France. *Presse medicale* (Paris, France 1983) 2006; 35(11 Pt 2): 1725–1732.
- Chen X, Sullivan PF. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The pharmacogenomics journal* 2003; 3(2): 77–96.
- Cherednyk YO, Anopryenko OV, Gorovenko NG, Feschenko YI. Early detection and group-specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* strains by method of single-nucleotide polymorphism analysis with hairpin primers. *Biopolym. Cell* 2013; 29(5): 375–381.
- Chiari M, Zanoni M, Alborali LG, Zanardi G, Avisani D, Tagliabue S, Gaffuri A, Pacciarini ML, Boniotti MB. Isolation of *Mycobacterium caprae* (Lechtal genotype) from red deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *Journal of wildlife diseases* 2014; 50(2): 330–333.
- Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using gyrB-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004; 99(7): 745–748.
- Clegg TA, Duignan A, Whelan C, Gormley E, Good M, Clarke J, Toft N, More SJ. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the gamma-interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary microbiology* 2011; 151(1-2): 68–76.
- Coad M, Downs SH, Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO. Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing. *The Veterinary record* 2008; 162(12): 382–384.

- Cohn DL. The effect of BCG vaccination on tuberculin skin testing. Does it matter? American journal of respiratory and critical care medicine 2001; 164(6): 915–916.
- Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology (Reading, England) 2002; 148(Pt 10): 2919–2928.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE3, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393(6685): 537–544.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward, JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001; 409(6823): 1007–1011.
- Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, Ernst JD, Gagneux S. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. Nature genetics 2010; 42(6): 498–503.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. Nature genetics 2013; 45(10): 1176–1182.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PloS one 2009; 4(11): e7815.

- Conlan AJK, Brooks Pollock E, McKinley TJ, Mitchell AP, Jones GJ, Vordermeier M, Wood JLN. Potential benefits of cattle vaccination as a supplementary control for bovine tuberculosis. *PLoS computational biology* 2015; 11(2): e1004038.
- Cook HC. Origins of ... tinctorial methods in histology. *Journal of Clinical Pathology* 1997; 50(9): 716–720.
- Copin R, Coscolla M, Seiffert SN, Bothamley G, Sutherland J, Mbayo G, Gagneux S, Ernst JD. Sequence diversity in the *pe\_pgrs* genes of *Mycobacterium tuberculosis* is independent of human T cell recognition. *mBio* 2014; 5(1): e00960-13.
- Corner L, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, Rothel JS. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian veterinary journal* 1990; 67(11): 389–392.
- Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in immunology* 2014; 26(6): 431–444.
- Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Rennsing K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, Dabrowski PW, Radonic A, Niemann S, Parkhill J, Couacy-Hymann E, Feldman J, Comas I, Boesch C, Gagneux S, Leendertz FH. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerging infectious diseases* 2013; 19(6): 969–976.
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, Kantor I de, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging infectious diseases* 1998; 4(1): 59–70.
- Costa BBT, Santos dAE, Medeiros GJM, Araujo AB de. R&D in Vaccines Targeting Neglected Diseases: An Exploratory Case Study Considering Funding for Preventive Tuberculosis Vaccine Development from 2007 to 2014. *BioMed research international* 2017; 2017: 4765719.
- Costa P, Botelho A, Couto I, Viveiros M, Inácio J. Standing of nucleic acid testing strategies in veterinary diagnosis laboratories to uncover *Mycobacterium tuberculosis* complex members. *Frontiers in molecular biosciences* 2014; 1.

- Costa P, Ferreira AS, Amaro A, Albuquerque T, Botelho A, Couto I, Cunha MV, Viveiros M, Inacio J. Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-nested probe-based real-time PCR. *PloS one* 2013; 8(11): e81337.
- Costabel U, Kroegel C. *Klinische Pneumologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis*: Thieme; 2013.
- Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR, JR. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999; 402(6757): 79–83.
- Cuccui J, Easton A, Chu KK, Bancroft GJ, Oyston PC, Titball RW, Wren BW. Development of signature-tagged mutagenesis in *Burkholderia pseudomallei* to identify genes important in survival and pathogenesis. *Infection and Immunity* 2007; 75(3): 1186–1195.
- Cvetnic Z, Katalinic-Jankovic V, Sostaric B, Spicic S, Obrovac M, Marjanovic S, Benic M, Kirin BK, Vickovic I. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2007; 11(6): 652–658.
- Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll J, Heersma H, Lillebaek T, Quitugua T, Rastogi N, Skuce RA, Sola C, van Soolingen D, Vincent V. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2001; 5(3): 216–219.
- Danilchanka O, Mailaender C, Niederweis M. Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; 52(7): 2503–2511.
- Darai G, Handermann M, Sonntag H-G. *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. Dordrecht: Springer; 2012.
- Davies P, Lalvani A, Thillai M, Gordon SB. *Clinical Tuberculosis, Fifth Edition*: CRC Press; 2014.
- Dawes SS, Warner DF, Tsenova L, Timm J, McKinney JD, Kaplan G, Rubin H, Mizrahi V. Ribonucleotide reduction in *Mycobacterium tuberculosis*: function and expression of

- genes encoding class Ib and class II ribonucleotide reductases. *Infection and Immunity* 2003; 71(11): 6124–6131.
- Delahay RJ, Wilson GJ, Smith GC, Cheeseman CL. Vaccinating badgers (*Meles meles*) against *Mycobacterium bovis*: the ecological considerations. *The Veterinary Journal* 2003; 166(1): 43–51.
- Den-Driesch A von, Peters J. *Geschichte der Tiermedizin: 5000 Jahre Tierheilkunde*: Schattauer; 2003.
- Denny GO, Wilesmith JW. Bovine tuberculosis in Northern Ireland: a case-control study of herd risk factors. *The Veterinary record* 1999; 144(12): 305–310.
- Diel R, Loytved G, Nienhaus A, Castell S, Detjen A, Geerdes-Fenge H, Haas W, Hauer B, Königstein B, Maffei D, Magdorf K, Priwitzer M, Zellweger JP, Loddenkemper R. New recommendations for contact tracing in tuberculosis. *German Central Committee against Tuberculosis. Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2011; 65(6): 359–378.
- Diguistini S, Liao NY, Platt D, Robertson G, Seidel M, Chan SK, Docking TR, Birol I, Holt RA, Hirst M, Mardis E, Marra MA, Hamelin RC, Bohlmann J, Breuil C, Jones SJ. De novo genome sequence assembly of a filamentous fungus using Sanger, 454 and Illumina sequence data. *Genome biology* 2009; 10(9): R94.
- Djelouadji Z, Raoult D, Daffe M, Drancourt M. A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS neglected tropical diseases* 2008; 2(6): e253.
- Doerks T, van Noort V, Minguéz P, Bork P. Annotation of the *M. tuberculosis* hypothetical orfeome: adding functional information to more than half of the uncharacterized proteins. *PloS one* 2012; 7(4): e34302.
- Domogalla J, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Gellert S, Müller M, Neuendorf E, Sedlmaier F, Buttner M. Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. *Journal of clinical microbiology* 2013; 51(5): 1381–1388.
- Domogalla JA. Subtypisierung bayerischer *Mycobacterium caprae* Isolate aus Wild- und Nutztier mittels der genetischen Variation in der Region of difference four (RD4) 2014: 1–88.

- Dondo A, Ferroglia E, Gorla M, Moda G, Ruocco L, Vignetta P, Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ. Economic Significance of Bovine Tuberculosis in Italy and Effect of *M. bovis* Infection in Wild Swine: Blackwell Publishing Ltd; 2008. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470344538.ch13/pdf>.
- Dover LG, Cerdano-Tarraga AM, Pallen MJ, Parkhill J, Besra GS. Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. FEMS microbiology reviews 2004; 28(2): 225–250.
- Driscoll JR. Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 2009; 551: 117–128.
- Durr PA, Hewinson RG, Clifton-Hadley RS. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 2000; 19(3): 675–688.
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, eds. The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. New York, NY: Springer-Verlag; 2006.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) related with the Animal health risks of feeding animals with ready to use dairy products without further treatment. EFSA Journal 2006; 4(4).
- Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of clinical microbiology 1988; 26(11): 2240–2245.
- Eklom R, Wolf JBW. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. Evolutionary applications 2014; 7(9): 1026–1042.
- Erlor W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J, Bartos M, Nagy G, Cvetnic Z, Zolnir-Dovc M, Pavlik I. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. caprae isolates from central Europe. Journal of clinical microbiology 2004; 42(5): 2234–2238.
- Espie IW, Hlokwé TM, Gey van Pittius, Nicolaas C, Lane E, Tordiffe ASW, Michel AL, Muller A, Kotze A, van Helden PD. Pulmonary infection due to *Mycobacterium bovis* in a black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) in South Africa. Journal of wildlife diseases 2009; 45(4): 1187–1193.



- Espinosa de los Monteros LE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Garcia MJF, Martin C, Dominguez L, Rafael L de, Baquero F, Gomez-Mampaso E, Blazquez J. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *Journal of clinical microbiology* 1998; 36(1): 239–242.
- Espitia C, Lacleste JP, Mondragon-Palomino M, Amador A, Campuzano J, Martens A, Singh M, Cicero R, Zhang Y, Moreno C. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? *Microbiology* (Reading, England) 1999; 145 (Pt 12): 3487–3495.
- Essey MA, Koller MA. Status of bovine tuberculosis in North America. *Veterinary microbiology* 1994; 40(1-2): 15–22.
- Estler CJ, Schmidt H. *Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis ; mit 281 Tabellen*: Schattauer; 2007.
- Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, Boese KA, Warren RE, Hong G. Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of clinical microbiology* 2004; 42(9): 4175–4180.
- Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, Hunt D, Tweddell A, Wood A, Anderson C, Hewinson RG, Smith NH, Hawkey PM, Sonnenberg P. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* (London, England) 2007; 369(9569): 1270–1276.
- Farhat MR, Sultana R, Iartchouk O, Bozeman S, Galagan J, Sisk P, Stolte C, Nebenzahl-Guimaraes H, Jacobson K, Sloutsky A, Kaur D, Posey J, Kreiswirth BN, Kurepina N, Rigouts L, Streicher EM, Victor TC, Warren RM, van Soolingen D, Murray M. Genetic Determinants of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and Their Diagnostic Value. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2016.
- Fell S, Brockl S, Buttner M, Rettinger A, Zimmermann P, Straubinger RK. Two alternative DNA extraction methods to improve the detection of *Mycobacterium-tuberculosis*-complex members in cattle and red deer tissue samples. *BMC Microbiology* 2016; 16: 213.

- Feng Y, Zhang Y, Ying C, Wang D, Du C. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 2015; 13(1): 4–16.
- Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, Qi W, Hazbon MH, Bobadilla dVM, Fyfe J, Garcia-Garcia L, Rastogi N, Sola C, Zozio T, Guerrero MI, Leon CI, Crabtree J, Angiuoli S, Eisenach KD, Durmaz R, Joloba ML, Rendon A, Sifuentes-Osornio J, Ponce dLA, Cave MD, Fleischmann R, Whittam TS, Alland D. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of Bacteriology* 2006; 188(2): 759–772.
- Fink M, Schleicher C, Gonano M, Prodinger WM, Pacciarini M, Glawischnig W, Ryser-Degiorgis M-P, Walzer C, Stalder GL, Lombardo D, Schobesberger H, Winter P, Buettner M. Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. *Emerging infectious diseases* 2015; 21(3): 464–467.
- Fischer K. H. Blobel und Th. Schliesser (Herausgeber), Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band V. 649 S., 105 Abb., 53 Tab. Jena 1985. VEB Gustav Fischer Verlag. M 142,00. *J Basic Microbiol* 1985; 25(10): 630.
- Fitzgerald SD, Kaneene JB. Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: hosts, pathology, surveillance, and control. *Veterinary pathology* 2013; 50(3): 488–499.
- Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, La Umayam, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs WR, JR, Venter JC, Fraser CM. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of Bacteriology* 2002; 184(19): 5479–5490.
- Flores L, Van T, Narayanan S, DeRiemer K, Kato-Maeda M, Gagneux S. Large Sequence Polymorphisms Classify *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Ancestral Spoligotyping Patterns. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(10): 3393–3395.
- Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, Mohaideen N, Ioerger TR, Sacchettini JC, Lipsitch M, Flynn JL, Fortune SM. Use of whole genome sequencing to

- estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nature genetics* 2011; 43(5): 482–486.
- Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *PNAS* 2003; 100(9): 5437–5442.
- Fritsche A, Engel R, Buhl D, Zellweger JP. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. *The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2004; 8(7): 903–904.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology (Reading, England)* 1998; 144 (Pt 5): 1189–1196.
- Frothingham R, Strickland PL, Bretzel G, Ramaswamy S, Musser JM, Williams DL. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Mycobacterium africanum* Isolates from West Africa. *Journal of clinical microbiology* 1999; 37(6): 1921–1926.
- Frye GH. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 1. Thoen CO, Steele JH, editor;: *Bovine Tuberculosis Eradication: The Program in the United States*. Iowa State University Press 1995: 119–181.
- Gagneux S, DeRiemer K, van T, Kato-Maeda M, Jong BC de, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(8): 2869–2873.
- Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *The Lancet. Infectious diseases* 2007; 7(5): 328–337.
- Galagan JE. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics* 2014; 15(5): 307–320.
- Gan M, Liu Q, Yang C, Gao Q, Luo T. Deep Whole-Genome Sequencing to Detect Mixed Infection of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS one* 2016; 11(7): e0159029.

- Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, Brown EJ. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular microbiology* 2004; 53(6): 1677–1693.
- Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJ, Brinkman FS, Brunham RC, Tang P. Whole-Genome Sequencing and Social-Network Analysis of a Tuberculosis Outbreak. *N Engl J Med* 2011; 364(8): 730–739.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus J-C, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *PNAS* 2003; 100(13): 7877–7882.
- Gavier-Widen D, Cooke MM, Gallagher J, Chambers MA, Gortazar C. A review of infection of wildlife hosts with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the 'no visible lesion' presentation. *New Zealand veterinary journal* 2009; 57(3): 122–131.
- Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, Am Maurer, Rieder HL, Schopfer K, Bodmer T. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet* (London, England) 1993; 342(8875): 841–844.
- Gengenbacher M, Mouritsen J, Schubert OT, Aebersold R, Kaufmann SHE. *Mycobacterium tuberculosis* in the Proteomics Era. *Microbiology Spectrum* 2014; 2(2).
- GFG; Gesellschaft für Fränkische Geschichte, Bayerische Akademie der Wissenschaften. Kommission für Bayerische Landesgeschichte. Zeitschrift für bayerische Landesgeschichte. Bd. 13: Beck; 1988.
- Gey van Pittius, Nicolaas C, Perrett KD, Michel AL, Keet DF, Hlokwe T, Streicher EM, Warren RM, van Helden PD. Infection of African buffalo (*Syncerus caffer*) by oryx bacillus, a rare member of the antelope clade of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of wildlife diseases* 2012; 48(4): 849–857.
- Gibson AL, Huard RC, van Gey Pittius NC, Lazzarini LCO, Driscoll J, Kurepina N, Zozio T, Sola C, Spindola SM, Kritski AL, Fitzgerald D, Kremer K, Mardassi H, Chitale P, Brinkworth J, Garcia de Viedma D, Gicquel B, Pape JW, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Warren RM, van Helden PD, Rastogi N, Suffys PN, Lapa e Silva J, Ho JL.

- Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(4): 1259–1267.
- Gilbert M, Mitchell A, Bourn D, Mawdsley J, Clifton-Hadley R, Wint W. Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. *Nature* 2005; 435(7041): 491–496.
- Gillen AL. *The Genesis of Germs: The Origin of Diseases and the Coming Plagues*: Master Books; 2007.
- Giltsdorf MJ, Ebel ED, Disney TW, Thoen CO, Steele JH, Giltsdorf MJ. *Benefit and Cost Assessment of the U.S. Bovine Tuberculosis Eradication Program*: Blackwell Publishing Ltd; 2008. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470344538.ch11/pdf>.
- Glaser L, Carstensen M, Shaw S, Robbe-Austerman S, Wunschmann A, Gear D, Stuber T, Thomsen B. Descriptive Epidemiology and Whole Genome Sequencing Analysis for an Outbreak of Bovine Tuberculosis in Beef Cattle and White-Tailed Deer in Northwestern Minnesota. *PloS one* 2016; 11(1): e0145735.
- Gole J, Gore A, Richards A, Chiu YJ, Fung HL, Bushman D, Chiang HI, Chun J, Lo YH, Zhang K. Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells. *Nature biotechnology* 2013; 31(12): 1126–1132.
- Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland) 2001; 81(1-2): 23–41.
- Goodchild AV, Downs SH, Upton P, Wood JLN, La Rua-Domenech R de. Specificity of the comparative skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. *The Veterinary record* 2015; 177(10): 258.
- Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular microbiology* 1999; 32(3): 643–655.
- Gormley E, Doyle M, Duignan A, Good M, More SJ, Clegg TA. Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN $\gamma$ ) assay. *Veterinary research* 2013; 44: 117.

- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary microbiology* 2006; 112(2-4): 171–179.
- Gortazar C, Torres MJ, Vicente J, Acevedo P, Reglero M, La Fuente J de, Negro JJ, Aznar-Martin J. Bovine tuberculosis in Donana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PloS one* 2008; 3(7): e2776.
- Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland) 2001; 81(1-2): 71–77.
- Gressner AM, Arndt T. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
- Griffin JM, Williams DH, Kelly GE, Clegg TA, O'Boyle I, Collins JD, More SJ. The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. *Preventive veterinary medicine* 2005; 67(4): 237–266.
- Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology* 1993; 10(5): 1057–1065.
- Grundmann K, Friedrich C. Zur Geschichte der Tuberkulosebehandlung. *Pharmazie in unserer Zeit* 2012; 41(1): 10–18.
- Guérin C. The history of BCG: early history: BCG vaccination against tuberculosis. London. Rosenthal SR 1953.
- Guo S, Xue R, Li Y, Wang SM, Ren L, Xu JJ. The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. *Medical hypotheses* 2012; 78(3): 389–392.
- Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, Musser JM. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *The Journal of infectious diseases* 2006; 193(1): 121–128.

- Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CA, Ricklefs SM, Hua S, Cousins DV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Musser JM. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 2002; 162(4): 1533–1543.
- Gutierrez M, Samper S, Gavigan JA, Garcia MJF, Martin C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *Journal of clinical microbiology* 1995; 33(11): 2953–2956.
- Haddad N, Ostyn A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, Inwald J, Hewinson RG, Durand B. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *Journal of clinical microbiology* 2001; 39(10): 3623–3632.
- Hain Lifescience. DNA STRIP und Geno Quick Technik\_deutsch 2015. [http://www.hain-lifescience.de/uploadfiles/file/technologie/Technik\\_dt.pdf](http://www.hain-lifescience.de/uploadfiles/file/technologie/Technik_dt.pdf).
- Hall L, Doerr KA, Wohlfel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *Journal of clinical microbiology* 2003; 41(4): 1447–1453.
- Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 2011; 49(7): 2562–2567.
- Hansen N, Seiler C, Rumpf J, Kraft P, Dlaske H, Abele-Horn M, Muellges W. Human Tuberculous Meningitis Caused by *Mycobacterium caprae*. *Case reports in neurology* 2012; 4(1): 54–60.
- Hartl DL, Clark AG. *Principles of population genetics*, 4th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 2007.
- Harz CO. *Actinomyces* 1877(5): 125–140.
- Hauer A, Cruz K de, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henault S, Bulach T, Banuls A-L, Biet F, Boschirola ML. Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PloS one* 2015; 10(2): e0117103.



- Hauer B, Castell S, Loddenkemper R. Resistente Tuberkulose. *Der Pneumologe* 2011; 8(1): 25–31.
- Hauer B, Fiebig L, Brodhun B, Haas W. Tuberculosis surveillance and control in Germany - An application of the Berlin Declaration Monitoring and Evaluation Framework. *European journal of microbiology & immunology* 2012; 2(4): 287–291.
- Hedvall E. Das Vorkommen der Rindertuberkulose beim Menschen und ihre Bekämpfung in Schweden. *Beiträge zur Klinik der Tuberkulose* 1943; 100(1-2): 156–164.
- Hedvall E. Quellen, Wege und Verhütung der Tuberkulose. *Beiträge zur Klinik der Tuberkulose* 1957; 117(1): 33–41.
- Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, Haas PE de, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and Immunity* 1991; 59(8): 2695–2705.
- Herold G. Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung. *Innere Medizin*; Köln 2012; 1-960.
- Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov DA, Feldman MW, Gagneux S. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS biology* 2008; 6(12): e311.
- Hesseling AC, Caldwell J, Cotton MF, Eley BS, Jaspan HB, Jennings K, Marais BJ, Nuttall J, Rabie H, Roux P, Schaaf HS. BCG vaccination in South African HIV - exposed infants - risks and benefits. *South African medical journal* 2009; 99(2): 88–91.
- Hesseling AC, Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Fine PEM, Godfrey-Faussett P, Beyers N. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV - infected children. *Vaccine* 2007; 25(1): 14–18.
- Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(14): 4871–4876.

- Hirschwald A. Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde. Bd. 1: A. Hirschwald; 1875.
- Hotter GS, Wards BJ, Mouat P, Besra GS, Gomes J, Singh M, Bassett S, Kawakami P, Wheeler PR, Lisle GW de, Collins DM. Transposon mutagenesis of Mb0100 at the ppe1-nrp locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. Journal of Bacteriology 2005; 187(7): 2267–2277.
- Huard RC, Fabre M, Haas P de, Lazzarini LCO, van Soolingen D, Cousins D, Ho JL. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Journal of Bacteriology 2006; 188(12): 4271–4287.
- Hughes AL, Friedman R, Murray M. Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerging infectious diseases 2002; 8(11): 1342–1346.
- Humphrey HM, Orloski KA, Olea-Popelka FJ. Bovine tuberculosis slaughter surveillance in the United States 2001–2010: assessment of its traceback investigation function. BMC veterinary research 2014; 10: 182.
- Hunermund G, Kropp R. The battle against cattle tuberculosis in Germany. Pneumologie (Stuttgart, Germany) 2006; 60(12): 772–776.
- Hunt DM, Sweeney NP, Mori L, Whalan RH, Comas I, Norman L, Cortes T, Arnvig KB, Davis EO, Stapleton MR, Green J, Buxton RS. Long-Range Transcriptional Control of an Operon Necessary for Virulence-Critical ESX-1 Secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology 2012; 194(9): 2307–2320.
- Im Al-Saqur, Al-Thwani AN, Im Al-Attar, Al-Mashhadani MS. Evaluation the virulence of *Mycobacterium bovis* isolated from milk samples through histopathological study in laboratory animals. International journal of mycobacteriology 2016; 5 Suppl 1: S90-S91.
- Ito K, Akiyama Y. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. Annual review of microbiology 2005; 59: 211–231.

- James BW, Williams A, Marsh PD. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *Journal of Applied Microbiology* 2000; 88(4): 669–677.
- Jenkins HE, Woodroffe R, Donnelly CA. The effects of annual widespread badger culls on cattle tuberculosis following the cessation of culling. *International journal of infectious diseases IJID official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2008; 12(5): 457–465.
- Jiang G, Wang G, Chen S, Yu X, Wang X, Zhao L, Ma Y, Dong L, Huang H. Pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in China. *Scientific reports* 2015; 5: 8538.
- Johnston WT, Gettinby G, Cox DR, Donnelly CA, Bourne J, Clifton-Hadley R, Le Fevre AM, McInerney JP, Mitchell A, Morrison WI, Woodroffe R. Herd-level risk factors associated with tuberculosis breakdowns among cattle herds in England before the 2001 foot-and-mouth disease epidemic. *Biology letters* 2005; 1(1): 53–56.
- Jones GJ, Whelan A, Clifford D, Coad M, Vordermeier HM. Improved Skin Test for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis by the Addition of Rv3020c-Derived Peptides. *Clinical and vaccine immunology CVI* 2012; 19(4): 620–622.
- Jullien D, Stenger S, Ernst WA, Modlin RL. CD1 presentation of microbial nonpeptide antigens to T cells. *The Journal of clinical investigation* 1997; 99(9): 2071–2074.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology* 1997; 35(4): 907–914.
- Kaneene JB, Hattey JA, Bolin CA, Averill J, Miller R. Survivability of *Mycobacterium bovis* on salt and salt-mineral blocks fed to cattle. *American journal of veterinary research* 2017; 78(1): 57–62.
- Kan-Sutton C, Jagannath C, Hunter RL, JR. Trehalose 6,6'-dimycolate on the surface of *Mycobacterium tuberculosis* modulates surface marker expression for antigen presentation and costimulation in murine macrophages. *Microbes and infection* 2009; 11(1): 40–48.

- Karls RK, Guarner J, McMurray DN, Birkness KA, Quinn FD. Examination of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor mutants using low-dose aerosol infection of guinea pigs suggests a role for SigC in pathogenesis. Microbiology (Reading, England) 2006; 152(Pt 6): 1591–1600.
- Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. Journal of clinical microbiology 2000; 38(1): 301–308.
- Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. Lancet (London, England) 2010; 375(9731): 2110–2119.
- Kazakov AE, Vassieva O, Gelfand MS, Osterman A, Overbeek R. Bioinformatics classification and functional analysis of PhoH homologs. In silico biology 2003; 3(1-2): 3–15.
- Keller PM, Hombach M, Bloemberg vG. 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. Biospektrum-Heidelberg 2010; 16(7): 755–759.
- Kinchen JM, Ravichandran KS. Phagosome maturation: going through the acid test. Nature reviews. Molecular cell biology 2008; 9(10): 781–795.
- King HC, Murphy A, James P, Travis E, Porter D, Hung Y-J, Sawyer J, Cork J, Delahay RJ, Gaze W, Courtenay O, Wellington EM. The variability and seasonality of the environmental reservoir of *Mycobacterium bovis* shed by wild European badgers. Scientific reports 2015; 5: 12318.
- Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, Bange FC, Bottger EC. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. Journal of clinical microbiology 1993; 31(11): 2882–2889.
- Koch R. Die Aetiologie der Tuberkulose. Klin Wochenschr 1932; 11(12): 490–492.
- Koessler J. Bericht über die 18. Österreichische Jägertagung 2012 zum Thema Jagd und Jagdzeiten - Ansprüche von Mensch und Wild ; 14. und 15. Februar 2012 LFZ Raumberg-Gumpenstein: Bekämpfung der Tuberkulose beim Rotwild im oberen Lechtal aktueller Stand. Irdning: LFZ; 2011.

- Koníčková-radochová M, Podojil M. The biology of the mycobacteria, vol. 1 physiology, identification and classification. *Folia Microbiol* 1983; 28(4): 341–342.
- Koser CU, Bryant JM, Becq J, Torok ME, Ellington MJ, Marti-Renom MA, Carmichael AJ, Parkhill J, Smith GP, Peacock SJ. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *The New England journal of medicine* 2013; 369(3): 290–292.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakus MA, Musser JM, Embden J. D. A. van. Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(8): 2607–2618.
- Krzywinska E, Krzywinski J, Schorey JS. Naturally occurring horizontal gene transfer and homologous recombination in *Mycobacterium*. *Microbiology (Reading, England)* 2004; 150(Pt 6): 1707–1712.
- Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Caused One-Third of Human *M. bovis*-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. *Journal of clinical microbiology* 2003; 41(7): 3070–3077.
- Kunnath-Velayudhan S, Porcelli SA. Recent Advances in Defining the Immunoproteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in immunology* 2013; 4: 335.
- KVG. Kommunikationsplattform VerbraucherInnenengesundheit-Tuberkulose (TBC) 2016. <https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/tiere/krankheiten/tbc.html>.
- Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wiser MF, Roahen HS, Kissinger P, Diem L, Crawford JT. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of clinical microbiology* 2003; 41(6): 2683–2685.
- La Corner. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary microbiology* 1994; 40(1-2): 53–63.
- La Corner. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary microbiology* 2006; 112(2-4): 303–312.

- La Corner, Clegg TA, More SJ, Williams DH, O'Boyle I, Costello E, Sleeman DP, Griffin JM. The effect of varying levels of population control on the prevalence of tuberculosis in badgers in Ireland. *Research in veterinary science* 2008; 85(2): 238–249.
- La Fuente Jd, Díez-Delgado I, Contreras M, Vicente J, Cabezas-Cruz A, Tobes R, Manrique M, López V, Romero B, Bezos J, Dominguez L, Sevilla IA, Garrido JM, Juste R, Madico G, Jones-López E, Gortazar C. Comparative Genomics of Field Isolates of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* Provides Evidence for Possible Correlates with Bacterial Viability and Virulence. *PLOS Negl Trop Dis* 2015 a; 9(11): e0004232.
- La Fuente J de, Díez-Delgado I, Contreras M, Vicente J, Cabezas-Cruz A, Manrique M, Tobes R, López V, Romero B, Dominguez L, Garrido JM, Juste R, Gortazar C. Complete Genome Sequences of Field Isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Genome announcements* 2015 b; 3(3).
- La Rua-Domenech R de, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in veterinary science* 2006; 81(2): 190–210.
- Lahlou O, Millet J, Chaoui I, Sabouni R, Filali-Maltouf A, Akrim M, El MM, Rastogi N, El AR. The genotypic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Moroccan patients reveals a predominance of Euro-American lineages. *PloS one* 2012; 7(10): e47113.
- Lahuerta-Marin A, Gallagher M, McBride S, Skuce R, Menzies F, McNair J, McDowell SWJ, Byrne AW. Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms. *Veterinary research* 2015; 46: 90.
- Landessanitätsdirektion Vorarlberg. Routinemäßige Tuberkulose-Untersuchungen 18.3.2016. <http://presse.vorarlberg.at/land/dist/vlk-51122.html>.
- Lasken RS. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10(9): 631–640.
- Laszlo AH, Derrington IM, Gundlach JH. MspA nanopore as a single-molecule tool: From sequencing to SPRNT. *Methods (San Diego, Calif.)* 2016; 105: 75–89.

- Laszlo AH, Derrington IM, Ross BC, Brinkerhoff H, Adey A, Nova IC, Craig JM, Langford KW, Samson JM, Daza R, Doering K, Shendure J, Gundlach JH. Decoding long nanopore sequencing reads of natural DNA. *Nature biotechnology* 2014; 32(8): 829–833.
- Laver T, Harrison J, O'Neill PA, Moore K, Farbos A, Paszkiewicz K, Studholme DJ. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular Detection and Quantification* 2015; 3: 1–8.
- Lazzarini LC, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, Shashkina E, Mello FC, Gibson AL, Virginio MJ, Marsico AG, Butler WR, Kreiswirth BN, Suffys PN, Lapa ES, JR, Ho JL. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of clinical microbiology* 2007; 45(12): 3891–3902.
- Lazzarini LCO, Rosenfeld J, Huard RC, Hill V, Lapa e Silva JR, DeSalle R, Rastogi N, Ho JL. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes that may derive from mixed strain infections are revealed by a novel computational approach. *Infection, genetics and evolution journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2012; 12(4): 798–806.
- Lehmann, K. B., Neumann, R. Atlas und Grundriss der Bacteriologie und Lehrbuch der speziellen bacteriologischen Diagnostik, 1st ed. München: Lehmanns Verlag; 1896.
- Lesellier S, Corner L, Costello E, Lyashchenko K, Greenwald R, Esfandiari J, Singh M, Hewinson RG, Chambers M, Gormley E. Immunological responses and protective immunity in BCG vaccinated badgers following endobronchial infection with *Mycobacterium bovis*. *Vaccine* 2009; 27(3): 402–409.
- Lesellier S, Palmer S, Dalley DJ, Davé D, Johnson L, Hewinson RG, Chambers MA. The safety and immunogenicity of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine in European badgers (*Meles meles*). *Innate Immunity and Vaccination* 2006; 112(1–2): 24–37.
- Levy-Frebault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International journal of systematic bacteriology* 1992; 42(2): 315–323.
- Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList - 10 years after. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2011; 91(1): 1–7.



- Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. The Journal of infectious diseases 2003; 187(1): 117–123.
- LGL. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. Tiergesundheit: Tuberkulose 2011; [http://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle\\_pilzinfektionen/tuberkulose/index.htm](http://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle_pilzinfektionen/tuberkulose/index.htm).
- Li Z, Yang L, Wang J, Shi W, Pawar RA, Liu Y, Xu C, Cong W, Hu Q, Lu T, Xia F, Guo W, Zhao M, Zhang Y. beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. Fish & shellfish immunology 2010; 29(1): 89–93.
- Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. Journal of clinical microbiology 1995; 33(1): 33–36.
- Lim A, Steibel JP, Coussens PM, Grooms DL, Bolin SR. Differential gene expression segregates cattle confirmed positive for bovine tuberculosis from antemortem tuberculosis test-false positive cattle originating from herds free of bovine tuberculosis. Veterinary medicine international 2012; 2012: 192926.
- Little TW, Naylor PF, Wilesmith JW. Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. The Veterinary record 1982; 111(24): 550–557.
- Liu X, Gutacker MM, Musser JM, Fu YX. Evidence for recombination in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology 2006; 188(23): 8169–8177.
- Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZ, Halachev M, Sergeant M, Penn CW, Robinson ER, Pallen MJ. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. Nature reviews. Microbiology 2012a; 10(9): 599–606.
- Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nature biotechnology 2012b; 30(5): 434–439.

- Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. Genomics, proteomics & bioinformatics 2016; 14(5): 265–279.
- Lugton IW, Wilson PR, Morris RS, Nugent G. Epidemiology and pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection of red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand. New Zealand veterinary journal 1998; 46(4): 147–156.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. Journal of Bacteriology 1996; 178(5): 1274–1282.
- Mairtin DO, Williams DH, Griffin JM, La Dolan, Eves JA. The effect of a badger removal programme on the incidence of tuberculosis in an Irish cattle population. Preventive veterinary medicine 1998; 34(1): 47–56.
- Majoor CJ, Magis-Escurra C, van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* Disease in Humans, the Netherlands, 1993–2007. Emerging infectious diseases 2011; 17(3): 457–463.
- Mammina C, Bonura C, Barchitta M, Quattrocchi A, Palermo M, Agodi A. Tuberculosis surveillance in Sicily, Italy. Epidemiologia e prevenzione 2014; 38(6 Suppl 2): 83–87.
- Mandal S, Bradshaw L, Anderson LF, Brown T, Evans JT, Drobniewski F, Smith G, Magee JG, Barrett A, Blatchford O, Laurenson IF, Seagar AL, Ruddy M, White PL, Myers R, Hawkey P, Abubakar I. Investigating transmission of *Mycobacterium bovis* in the United Kingdom in 2005 to 2008. Journal of clinical microbiology 2011; 49(5): 1943–1950.
- Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, Langford KW, Hopper MK, Gillgren N, Pavlenok M, Niederweis M, Gundlach JH. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. Nature biotechnology 2012; 30(4): 349–353.
- Martin-Hernando MP, Torres MJ, Aznar J, Negro JJ, Gandia A, Gortazar C. Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Journal of comparative pathology 2010; 142(1): 43–50.
- Matthys H, Seeger W. Klinische Pneumologie: Springer Berlin Heidelberg; 2009.

- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001; 98(4): 1901–1906.
- McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller RB, JR, Gray GC. Humans and cattle: a review of bovine zoonoses. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 2014; 14(1): 1–19.
- McElroy PD, Rothenberg RB, Varghese R, Woodruff R, Minns GO, Muth SQ, La Lambert, Ridzon R. A network-informed approach to investigating a tuberculosis outbreak: implications for enhancing contact investigations. The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 2003; 7(12 Suppl 3): S486-93.
- McEvoy CRE, Cloete R, Müller B, Schürch AC, van Helden PD, Gagneux S, Warren RM, Pittius, Nicolaas C. Gey van. Comparative Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* *pe* and *ppe* Genes Reveals High Sequence Variation and an Apparent Absence of Selective Constraints. PLOS ONE 2012; 7(4): e30593.
- Médigue C, Cole ST, Camus J-C, Pryor MJ. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology 2002; 148(10): 2967–2973.
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nature reviews. Genetics 2010; 11(1): 31–46.
- Meyer S, Naumann L, Landthaler M, Vogt T. Lupus vulgaris caused by *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae*. British Journal of Dermatology 2005; 153(1): 220–222.
- Michel AL, Müller B, van Helden PD. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? Zoonoses: Advances and Perspectives 2010; 140(3–4): 371–381.
- Milian-Suazo F, Harris B, Díaz CA, Romero Torres C, Stuber T, Ojeda GA, Loredó AM, Soria MP, PAYEUR JB. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: Usefulness in international trade. Preventive veterinary medicine 2008; 87(3–4): 261–271.

- Miller RS, Sweeney SJ. *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in North American wildlife: current status and opportunities for mitigation of risks of further infection in wildlife populations. *Epidemiology and infection* 2013; 141(7): 1357–1370.
- Millington KA, Fortune SM, Low J, Garces A, Hingley-Wilson SM, Wickremasinghe M, Kon OM, Lalvani A. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(14): 5730–5735.
- Miyoshi-Akiyama T, Satou K, Kato M, Shiroma A, Matsumura K, Tamotsu H, Iwai H, Teruya K, Funatogawa K, Hirano T, Kirikae T. Complete annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann (ATCC35812) (Kurono). *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland) 2015; 95(1): 37–39.
- Morton G. *Phthisiologia*, 8th ed. London; 1689.
- Moser I, Kohler H, Menge C. Tuberculosis in cattle-surprisingly re-emerging or continuously present?. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere* 2014; 42(4): 240-9; quiz 250.
- Moser I, Sirimalaisuwan A. Tuberkulose und andere Mykobakterien - Tiere als Infektionsquellen (für den Menschen). *Pneumologie* 2004; 58(04): 273–276.
- Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The Journal of infectious diseases* 2002; 186(1): 74–80.
- Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K, Cousins D, Behr MA. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Bacteriology* 2005; 187(18): 6386–6395.
- Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, Niemann S, Kremer K, Desmond EP, Kato-Maeda M, Behr M. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *Journal of clinical microbiology* 2004; 42(8): 3594–3599.

- Muller B, Durr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJM, Parsons SDC, van Helden PD, Zinsstag J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging infectious diseases* 2013; 19(6): 899–908.
- Muller R, Roberts CA, Brown TA. Genotyping of ancient *Mycobacterium tuberculosis* strains reveals historic genetic diversity. *Proceedings. Biological sciences* 2014; 281(1781): 20133236.
- Murphy D, Gormley E, Collins DM, McGrath G, Sovsic E, Costello E, Corner LAL. Tuberculosis in cattle herds are sentinels for *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*): the Irish Greenfield Study. *Veterinary microbiology* 2011; 151(1-2): 120–125.
- Murphy D, Gormley E, Costello E, O'Meara D, CORNER LAL. The prevalence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) as determined by enhanced post mortem examination and bacteriological culture. *Research in veterinary science* 2010; 88(1): 1–5.
- Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. *Bulletin of the World Health Organization* 2002; 80(6): 477–482.
- Murray MH, Becker DJ, Hall RJ, Hernandez SM. Wildlife health and supplemental feeding: A review and management recommendations. *Biological Conservation* 2016; 204, Part B: 163–174.
- Mustafa AS, Cockle PJ, Shaban F, Hewinson RG, Vordermeier HM. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle. *Clinical and Experimental Immunology* 2002; 130(1): 37–42.
- Namouchi A, Didelot X, Schock U, Gicquel B, Rocha EPC. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome research* 2012; 22(4): 721–734.
- Nasr Esfahani B, Moghim S, Ghasemian Safaei H, Moghoofei M, Sedighi M, Hadifar S. Phylogenetic Analysis of Prevalent Tuberculosis and Non-Tuberculosis Mycobacteria in Isfahan, Iran, Based on a 360 bp Sequence of the rpoB Gene. *Jundishapur journal of microbiology* 2016; 9(4): e30763.

- Nebreda T, Álvarez-Prida E, Blanco B, Remacha M, Samper S, Jiménez M. Peritoneal tuberculosis due to *Mycobacterium caprae*. IDCases 2016; 4: 50–52.
- Neonakis IK, Gitti Z, Petinaki E, Maraki S, Spandidos DA. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26(2): 151–152.
- Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P. Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie: Georg Thieme Verlag; 2009.
- Niemann S, Harmsen D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by gyrB DNA Sequence Polymorphism Analysis. Journal of clinical microbiology 2000; 38(9): 3231–3234.
- Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2002; 52(Pt 2): 433–436.
- Nienhaus A. Tuberkulose als Berufskrankheit: ein Leitfaden zur Begutachtung und Vorsorge: ecomed Medizin; 2009.
- Nigsch A. Tuberkulose beim Wild im Raum Vorarlberg: Expertise zur aktuellen Situation 2015/2016. [https://www.vorarlberg.at/pdf/expertise\\_tbc\\_wildvorarlbg.pdf](https://www.vorarlberg.at/pdf/expertise_tbc_wildvorarlbg.pdf).
- Nishi JS, Shury T, Elkin BT. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: Strategies for management and research. 4th International Conference on *Mycobacterium bovis* 2006; 112(2–4): 325–338.
- Nivala J, Marks DB, Akeson M. Unfoldase-mediated protein translocation through an alpha-hemolysin nanopore. Nature biotechnology 2013; 31(3): 247–250.
- O'Brien DJ, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Berry DE. Management of bovine tuberculosis in Michigan wildlife: Current status and near term prospects. Special issue: 5th International Conference on *Mycobacterium bovis* 2011; 151(1–2): 179–187.

- O'Brien DJ, Schmitt SM, Berry DE, Fitzgerald SD, Lyon TJ, Vanneste JR, Cooley TM, Hogle SA, Fierke JS. Estimating the true prevalence of *Mycobacterium bovis* in free-ranging elk in Michigan. *Journal of wildlife diseases* 2008; 44(4): 802–810.
- O'Brien DJ, Schmitt SM, Berry DE, Fitzgerald SD, Vanneste JR, Lyon TJ, Magsig D, Fierke JS, Cooley TM, Zwick LS, Thomsen BV. Estimating the true prevalence of *Mycobacterium bovis* in hunter-harvested white-tailed deer in Michigan. *Journal of wildlife diseases* 2004; 40(1): 42–52.
- O'Brien R, Flynn O, Costello E, O'Grady D, Rogers M. Identification of a Novel DNA Probe for Strain Typing *Mycobacterium bovis* by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of clinical microbiology* 2000; 38(5): 1723–1730.
- O'Hagan MJ, Courcier EA, Drewe JA, Gordon AW, McNair J, Abernethy DA. Risk factors for visible lesions or positive laboratory tests in bovine tuberculosis reactor cattle in Northern Ireland. *Preventive veterinary medicine* 2015; 120(3-4): 283–290.
- OIE, Bovine tuberculosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2016 2009(Chapter 2.4.6): 1–17.
- Olano J, Lopez B, Reyes A, Lemos MdP, Correa N, Del Portillo P, Barrera L, Robledo J, Ritacco V, Zambrano MM. Mutations in DNA repair genes are associated with the Haarlem lineage of *Mycobacterium tuberculosis* independently of their antibiotic resistance. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2007; 87(6): 502–508.
- Olea-Popelka F, Muwonge A, Perera A, Dean AS, Mumford E, Erlacher-Vindel E, Forcella S, Silk BJ, Ditiu L, El IA, Raviglione M, Cosivi O, LoBue P, Fujiwara PI. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *The Lancet. Infectious diseases* 2017; 17(1): e21-e25.
- Olea-Popelka FJ, Fitzgerald P, White P, McGrath G, Collins JD, O'Keeffe J, Kelton DF, Berke O, More S, Martin SW. Targeted badger removal and the subsequent risk of bovine tuberculosis in cattle herds in county Laois, Ireland. *Preventive veterinary medicine* 2009; 88(3): 178–184.
- Olsen I, Boysen P, Kulberg S, Hope JC, Jungersen G, Storset AK. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infection and Immunity* 2005; 73(9): 5628–5635.



- O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 1995; 76 Suppl 1: 1–46.
- Ostertag R von. Die Bekämpfung der Tuberkulose des Rindes mit besonderer Berücksichtigung der klinischen und bakteriologischen Feststellung; R. Schoetz; 1913.
- Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: A systematic review. *The Lancet Infectious Diseases* 2004; 4(12): 761–776.
- Palisson A, Courcoul A, Durand B. Role of Cattle Movements in Bovine Tuberculosis Spread in France between 2005 and 2014. *PloS one* 2016; 11(3): e0152578.
- Palmer MV. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transboundary and emerging diseases* 2013; 60 Suppl 1: 1–13.
- Palmer MV, Waters WR, Thacker TC, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clinical and vaccine immunology CVI* 2006; 13(3): 387–394.
- Palmer MV, Waters WR, Whipple DL. Lesion development in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary pathology* 2002; 39(3): 334–340.
- Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 - A Medical Textbook*; 2007.
- Pan Y, Yang X, Duan J, Lu N, Leung AS, Tran V, Hu Y, Wu N, Liu D, Wang Z, Yu X, Chen C, Zhang Y, Wan K, Liu J, Zhu B. Whole-Genome Sequences of Four *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Strains ▽. *Journal of Bacteriology* 2011; 193(12): 3152–3153.
- Parra A, Garcia N, Garcia A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso dMJ. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology* 2008; 127(3-4): 315–324.
- Pate M, Svára T, Gombac M, Paller T, Zolnir-Dovc M, Emersic I, Prodinger WM, Bartos M, Zdovc I, Krt B, Pavlik I, Cvetnic Z, Pogacnik M, Ocepek M. Outbreak of tuberculosis

- caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health 2006; 53(8): 387–392.
- Pavlík I, Bartl J, Parmová I, Havelková I, Kubín M, Bazant J. Occurrence of bovine tuberculosis in animals and humans in the Czech Republic in the years 1969 to 1996. Veterinary Medicine (Czech) 1998(43): 221–231.
- Payeur JB, Church S, Mosher L, Robinson-Dunn B, Schmitt S, Whipple D. Bovine Tuberculosis in Michigan Wildlife. Annals of the New York Academy of Sciences 2002; 969(1): 259–261.
- Payne A, Chappa S, Hars J, Dufour B, Gilot-Fromont E. Wildlife visits to farm facilities assessed by camera traps in a bovine tuberculosis-infected area in France. European Journal of Wildlife Research 2015; 62(1): 33–42.
- Pepperell C, Hoepfner VH, Lipatov M, Wobeser W, Schoolnik GK, Feldman MW. Bacterial Genetic Signatures of Human Social Phenomena among *M. tuberculosis* from an Aboriginal Canadian Population. Molecular Biology and Evolution 2010; 27(2): 427–440.
- Perez-Lago L, Comas I, Navarro Y, Gonzalez-Candelas F, Herranz M, Bouza E, Garcia-de-Viedma D. Whole genome sequencing analysis of intrapatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. The Journal of infectious diseases 2014; 209(1): 98–108.
- Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, Pacciarini M, Pasquali P. Tuberculosis in domestic animal species. Research in veterinary science 2014; 97 Suppl: S78-85.
- Phelan J, Coll F, McNerney R, Ascher DB, Pires DEV, Furnham N, Coeck N, Hill-Cawthorne GA, Nair MB, Mallard K, Ramsay A, Campino S, Hibberd ML, Pain A, Rigouts L, Clark TG. *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequencing and protein structure modelling provides insights into anti-tuberculosis drug resistance. BMC medicine 2016; 14: 31.
- Philipp WJ, Nair S, Guglielmi G, Lagranderie M, Gicquel B, Cole ST. Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*. Microbiology 1996; 142(11): 3135–3145.

- Phillips C, Foster C, Morris P, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in veterinary science* 2003; 74(1): 1–15.
- Pichat C, Couvin D, Carret G, Frédénucci I, Jacomo V, Carricajo A, Boisset S, Dumitrescu O, Flandrois JP, Lina G, Rastogi N. Combined Genotypic, Phylogenetic, and Epidemiologic Analyses of *Mycobacterium tuberculosis* Genetic Diversity in the Rhône Alpes Region, France. *PloS one* 2016; 11(4).
- Piddington DL, Fang FC, Laessig T, Cooper AM, Orme IM, Buchmeier NA. Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infection and Immunity* 2001; 69(8): 4980–4987.
- Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host & Microbe* 2008; 3(6): 399–407.
- Pinsky BA, Banaei N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(7): 2241–2246.
- Prodinger WM, Brandstatter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirola ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnik A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43(10): 4984–4992.
- Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schonbauer M, Glawischnig W. Infection of Red Deer, Cattle, and Humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in Western Austria. *Journal of clinical microbiology* 2002; 40(6): 2270–2272.
- Prodinger WM, Indra A, Koksalan OK, Kilicaslan Z, Richter E. *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert review of anti-infective therapy* 2014; 12(12): 1501–1513.
- Radomski N, Kreitmann L, McIntosh F, Behr MA. The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues. *PloS one* 2013; 8(10): e78749.

- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats, 10th ed. Saintt Louis: Elsevier Health Sciences UK; 2006.
- Ragheb MN, Ford CB, Chase, Lin PL, Flynn JL, Fortune SM. The mutation rate of mycobacterial repetitive unit loci in strains of *M. tuberculosis* from cynomolgus macaque infection. BMC genomics 2013; 14: 145.
- Ramos DF, Tavares L, da SP, Dellagostin OA. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: A review. Brazilian Journal of Microbiology 2014; 45(2): 365–372.
- Ramsey DS, O'Brien DJ, Smith RW, Cosgrove MK, Schmitt SM, Rudolph BA. Management of on-farm risk to livestock from bovine tuberculosis in Michigan, USA, white-tailed deer: Predictions from a spatially-explicit stochastic model. Preventive veterinary medicine 2016; 134: 26–38.
- Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. PloS one 2011; 6(8): e23481.
- Reimoser F. Rothirsch im Rätikon. Drei Länder, drei Jagdsysteme, eine Wildart. [http://wildlife.reimoser.info/download/2015\\_Reimoser\\_Rotwild%20im%20Raetikon.pdf](http://wildlife.reimoser.info/download/2015_Reimoser_Rotwild%20im%20Raetikon.pdf).
- Reisner BS, Am Gatson, Woods GL. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. Journal of clinical microbiology 1994; 32(12): 2995–2998.
- Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, Gordon SV, Hewinson RG, Williamson RA, Carr MD. Conclusive Evidence That the Major T-cell Antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex ESAT-6 and CFP-10 Form a Tight, 1:1 Complex and Characterization of the Structural Properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6·CFP-10 Complex. Journal of Biological Chemistry 2002; 277(24): 21598–21603.
- Rettinger A, Broeckl S, Fink M, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Domogalla J, Just F, Gellert S, Straubinger RK, Buettner M. The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for Subtyping *Mycobacterium caprae* Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes. Transboundary and emerging diseases 2015.

- Ribeiro-Lima J, Carstensen M, Cornicelli L, Forester JD, Wells SJ. Patterns of Cattle Farm Visitation by White-Tailed Deer in Relation to Risk of Disease Transmission in a Previously Infected Area with Bovine Tuberculosis in Minnesota, USA. *Transboundary and emerging diseases* 2016.
- Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *Journal of clinical microbiology* 2003; 41(6): 2672–2675.
- Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, Gaillard JL, Pierre-Audigier C. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of clinical microbiology* 1999; 37(3): 852–857.
- Robertson A, Delahay RJ, McDonald RA, Aylett P, Henderson R, Gowtage S, Chambers MA, Carter SP. Behaviour of European badgers and non-target species towards candidate baits for oral delivery of a tuberculosis vaccine. *Preventive veterinary medicine* 2016; 135: 95–101.
- Rodriguez E, Sanchez LP, Perez S, Herrera L, Jimenez MS, Samper S, Iglesias MJ. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2009; 13(12): 1536–1541.
- Rodriguez JG, Mejia GA, Portillo PD, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 1995; 141(9): 2131–2138.
- Rodriguez S, Bezos J, Romero B, Juan L de, Alvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Javed MT, Saez-Llorente JL, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerging infectious diseases* 2011; 17(3): 532–535.
- Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in veterinary science* 2014; 97 Suppl: S5-S19.
- Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerging infectious diseases* 2008; 14(6): 909–916.

- Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Ruckert C, Nubel U, Blom J, Wirth T, Jaenicke S, Schuback S, Rusch-Gerdes S, Supply P, Kalinowski J, Niemann S. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. PLoS medicine 2013; 10(2): e1001387.
- Rolle M, Mayr A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten. Lehrbuch für Praxis und Studium. Herausgegeben von A. Mayr, 6., neu bearbeitete Auflagen von B. Gedenk, O.-R. Kaaden, H. Mahnel und A. Mayr. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1993. 9th ed. Volume 38.
- Roring S, Scott A, Brittain D, Walker I, Hewinson G, Neill S, Skuce R. Development of Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of Results with Those Obtained by Using Existing Exact Tandem Repeats and Spoligotyping. Journal of clinical microbiology 2002; 40(6): 2126–2133.
- Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. Journal of clinical microbiology 1998; 36(1): 139–147.
- Rothel JS, Jones SL, La Corner, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Australian veterinary journal 1990; 67(4): 134–137.
- Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C, Donoghue H, Spigelman M, Brittain D. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2001; 33(3): 305–311.
- Ryan TJ, Livingstone PG, Ramsey DS, Lisle GW de, Nugent G, Collins DM, Buddle BM. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. Veterinary microbiology 2006; 112(2-4): 211–219.

- Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* 2014; 507(7491): 181–189.
- Sakai S, Mayer-Barber KD, Barber DL. Defining Features of Protective CD4 T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current opinion in immunology* 2014; 0: 137–142.
- Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS medicine* 2009; 6(2): e2.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(12): 5463–5467.
- Santos N, Correia-Neves M, Ghebremichael S, Kallenius G, Svenson SB, Almeida V. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *Journal of wildlife diseases* 2009; 45(4): 1048–1061.
- Savov D. Resistance of tuberculosis mycobacteria in raw-dried and raw-fumigated sausages. *Veterinarno-meditsinski nauki* 1975; 12(7): 39–43.
- Schellner H. Risk of infection incattle grazing pastures contaminated with tubercle bacilli. *Rindertuberkulose* 1956(5): 179–188.
- Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Whelan AO, Coad M, Gormley E, Buddle BM, Palmer M, Thacker T, McNair J, Welsh M, Hewinson RG, Oesch B. Bovine tuberculosis: effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. *Veterinary immunology and immunopathology* 2010; 136(1-2): 1–11.
- Schiller I, Waters WR, Vordermeier HM, Jemmi T, Welsh M, Keck N, Whelan A, Gormley E, Boschioli ML, Moyon JL, Vela C, Cagiola M, Buddle BM, Palmer M, Thacker T, Oesch B. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: trade, surveillance and diagnostics. *Veterinary microbiology* 2011; 151(1-2): 153–159.
- Schiller I, Waters WR, Vordermeier HM, Nonnecke B, Welsh M, Keck N, Whelan A, Sigafosse T, Stamm C, Palmer M, Thacker T, Hardegger R, Marg-Haufe B, Raeber A, Oesch B. Optimization of a Whole-Blood Gamma Interferon Assay for Detection of *Mycobacterium bovis*-Infected Cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(8): 1196–1202.



- Schmitt SM, O'Brien DJ, Bruning-Fann CS, Fitzgerald SD. Bovine Tuberculosis in Michigan Wildlife and Livestock. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 969(1): 262–268.
- Schoening JM, Cerny N, Prohaska S, Wittenbrink MM, Smith NH, Bloemberg G, Pewsner M, Schiller I, Origi FC, Ryser-Degiorgis M-P. Surveillance of bovine tuberculosis and risk estimation of a future reservoir formation in wildlife in Switzerland and Liechtenstein. *PLOS ONE* 2013; 8(1): e54253-e54253.
- Schoepf K, Prodinger WM, Glawischnig W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Kofer J, Schmoll F. A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN veterinary science* 2012; 2012: 245138.
- Schoepf K, Weikel J, Fritz J. Zur Epizootiologie der Rindertuberkulose in Tirol – eine retrospektive Analyse 2010.
- Schurch AC, Kremer K, Daviena O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, van Soolingen D. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *Journal of clinical microbiology* 2010; 48(9): 3403–3406.
- Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 2009; 27(11): 1710–1716.
- Sengstake S, Bablishvili N, Schuitema A, Bzekalava N, Abadia E, Beer J de, Tadumadze N, Akhalaia M, Tuin K, Tukvadze N, Aspindzelashvili R, Bachiyska E, Panaiotov S, Sola C, van Soolingen D, Klatser P, Anthony R, Bergval I. Optimizing multiplex SNP-based data analysis for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *BMC genomics* 2014; 15: 572.
- Shell SS, Prestwich EG, Baek S-H, Shah RR, Sassetti CM, Dedon PC, Fortune SM. DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens* 2013; 9(7): e1003419.
- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 2008; 26(10): 1135–1145.

- Sheridan M. Progress in tuberculosis eradication in Ireland. *Veterinary microbiology* 2011; 151(1-2): 160–169.
- Sheridan M, Good M, More SJ, Gormley E. The impact of an integrated wildlife and bovine tuberculosis eradication program in Ireland. In: Thoen CO, Steele JH, Kaneene JB, eds. *Zoonotic tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria*. Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2014: 323–340.
- Shitaye JE, Horvathova A, Bartošova L, Moravkova M, Kaevska M, Donnelly N, Pavlik I. Distribution of Non-Tuberculosis Mycobacteria in Environmental Samples from a Slaughterhouse and in Raw and Processed Meats. *Czech J. Food Sci.* 2009: 194–202.
- Sidders B, Pirson C, Hogarth PJ, Hewinson RG, Stoker NG, Vordermeier HM, Ewer K. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection and Immunity* 2008; 76(9): 3932–3939.
- Silva-Miranda M, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria? *Journal of Immunology Research* 2012; 2012.
- Sintchenko V, Jelfs P, Dally M, Crichton T, Gilbert GL. A case of urinary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subspecies caprae. *Pathology* 2006; 38(4): 376–378.
- Sirakova TD, Dubey VS, Kim HJ, Cynamon MH, Kolattukudy PE. The largest open reading frame (pks12) in the *Mycobacterium tuberculosis* genome is involved in pathogenesis and dimycocerosyl phthiocerol synthesis. *Infection and Immunity* 2003; 71(7): 3794–3801.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *The New England journal of medicine* 1994; 330(24): 1703–1709.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical microbiology reviews* 2003; 16(3): 463–496.

- Smith NH, Gordon SV, La Rua-Domenech R de, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nature reviews. Microbiology 2006; 4(9): 670–681.
- Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular Biology of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Current topics in microbiology and immunology 2013; 374: 53–80.
- Smittipat N, Billamas P, Palittapongarnpim M, Thong-On A, Temu MM, Thanakijcharoen P, Karnkawinpong O, Palittapongarnpim P. Polymorphism of Variable-Number Tandem Repeats at Multiple Loci in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of clinical microbiology 2005; 43(10): 5034–5043.
- Soini H, Bottger EC, Viljanen MK. Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. Journal of clinical microbiology 1994; 32(12): 2944–2947.
- Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infection, genetics and evolution journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 2003; 3(2): 125–133.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proceedings of the National Academy of Sciences 1997; 94(18): 9869–9874.
- Ssengooba W, Jong BC de, Joloba ML, Cobelens FG, Meehan CJ. Whole genome sequencing reveals mycobacterial microevolution among concurrent isolates from sputum and blood in HIV infected TB patients. BMC infectious diseases 2016; 16: 371.
- Stackebrandt E, Smida J. The phylogeny of the genus *Mycobacterium* and development of rDNA probes for rapid identification of slow growing mycobacteria 1988: 244–250.
- Stahl DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. Journal of Bacteriology 1990; 172(1): 116–124.

- Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO, Bates JH. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995; 151(4): 1267–1268.
- Steenken W, Oatway WH, Petroff SA. Biological studies of the tubercle bacillus: Dissociation and pathogenicity of the r and s variants of the human tubercle bacillus (H37). *The Journal of experimental medicine* 1934; 60(4): 515–540.
- Stein D. Nanopore Sequencing: Forcing Improved Resolution. *Biophysical Journal* 2015; 109(10): 2001–2002.
- Stoop EJM, Schipper T, Rosendahl Huber SK, Nezhinsky AE, Verbeek FJ, Gurcha SS, Besra GS, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Bitter W, van der Sar AM. Zebrafish embryo screen for mycobacterial genes involved in the initiation of granuloma formation reveals a newly identified ESX-1 component. *Disease models & mechanisms* 2011; 4(4): 526–536.
- Strohmeier GR, Fenton MJ. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes and Infection* 1999; 1(9): 709–717.
- Stucki D, Ballif M, Bodmer T, Coscolla M, Maurer A-M, Droz S, Butz C, Borrell S, Langle C, Feldmann J, Furrer H, Mordasini C, Helbling P, Rieder HL, Egger M, Gagneux S, Fenner L. Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strain-specific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing. *The Journal of infectious diseases* 2015; 211(8): 1306–1316.
- Stucki D, Gagneux S. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2013; 93(1): 30–39.
- Stucki D, Malla B, Hostettler S, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D, Borrell S, Fenner L, Comas I, Coscollà M, Gagneux S. Two New Rapid SNP-Typing Methods for Classifying *Mycobacterium tuberculosis* Complex into the Main Phylogenetic Lineages. *PLOS ONE* 2012; 7(7): e41253.
- Suazo FM, Escalera AMA, Torres RM. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. *Preventive veterinary medicine* 2003; 58(1–2): 1–13.

- Suerbaum S, Hahn H, Burchard GD, Kaufmann S, Schulz TF. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: Springer Berlin Heidelberg; 2012.
- Sun R, Converse PJ, Ko C, Tyagi S, Morrison NE, Bishai WR. *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Molecular microbiology* 2004; 52(1): 25–38.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, Haas P de, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44(12): 4498–4510.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of clinical microbiology* 2001; 39(10): 3563–3571.
- Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, Majlessi L, Criscuolo A, Tap J, Pawlik A, Fiette L, Orgeur M, Fabre M, Parmentier C, Frigui W, Simeone R, Boritsch EC, Debie A-S, Willery E, Walker D, Quail MA, Ma L, Bouchier C, Salvignol G, Sayes F, Cascioferro A, Seemann T, Barbe V, Locht C, Gutierrez M-C, Leclerc C, Bentley SD, Stinear TP, Brisse S, Medigue C, Parkhill J, Cruveiller S, Brosch R. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature genetics* 2013; 45(2): 172–179.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology* 2000; 36(3): 762–771.
- Supply P, Warren RM, Banuls AL, Lesjean S, van der Spuy GD, La Lewis, Tibayrenc M, van Helden PD, Locht C. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Molecular microbiology* 2003; 47(2): 529–538.

- Tailleux L, Neyrolles O, Honore-Bouakline S, Perret E, Sanchez F, Abastado J-P, Lagrange PH, Gluckman JC, Rosenzweig M, Herrmann J-L. Constrained Intracellular Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 2003; 170(4): 1939–1948.
- Tar SY, Bozdemir B, Gurel MS, Bilgin FU, Baran MF, Demirkesen C. *Mycobacterium bovis* caprae: a rare agent of lupus vulgaris. *Clinical and experimental dermatology* 2009; 34(4): 532–533.
- Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology (Reading, England)* 2007 a; 153(Pt 4): 1243–1249.
- Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC veterinary research* 2007 b; 3(1): 1.
- Taylor MJ, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. *Journal of clinical microbiology* 2001; 39(4): 1272–1278.
- Tesink J. Infection of cattle by humans with bovine-type tubercle bacteria. *Tijdschrift voor ziekenverpleging* 1970; 23(16): 824.
- Thacker TC, Harris B, Palmer MV, Waters WR. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using *IS6110* real-time PCR. *BMC veterinary research* 2011; 7: 50.
- Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. *Indian journal of microbiology* 2012; 52(2): 289–291.
- Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL. *IS6110*, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic acids research* 1990; 18(1): 188.
- Thoen C, LoBue P, Kantor I de. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. 4th International Conference on *Mycobacterium bovis* 2006; 112(2–4): 339–345.

- Thoen CO, Steele JH, Kaneene JB, eds. Zoonotic tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2014.
- Thom M, Howard C, Villarreal-Ramos B, Mead E, Vordermeier M, Hope J. Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2008; 88(4): 324–334.
- Thompson PJ, Cousins DV, Gow BL, Collins DM, Williamson BH, Dagnia HT. Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *The American review of respiratory disease* 1993; 147(1): 164–167.
- Tompkins DM, Ramsey DSL, Cross ML, Aldwell FE, Lisle GW de, Buddle BM. Oral vaccination reduces the incidence of tuberculosis in free-living brushtail possums. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 2009; 276(1669): 2987–2995.
- Torgerson PR, Torgerson DJ. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends in microbiology* 2010; 18(2): 67–72.
- Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, Chavez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Singh M, Gonzalez-Aguirre A, Ponce dL-GA, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-Del-Valle M. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *PLoS neglected tropical diseases* 2013; 7(4): e2177.
- Tsairidou S, Brotherstone S, Coffey M, Bishop SC, Woolliams JA. Quantitative genetic analysis of the bTB diagnostic single intradermal comparative cervical test (SICCT). *Genetics, selection, evolution GSE* 2016; 48(1): 90.
- Tsao K, Robbe-Austerman S, Miller RS, Portacci K, Gear DA, Webb C. Sources of bovine tuberculosis in the United States. *Infection, genetics and evolution journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2014; 28: 137–143.
- Tweddle NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Veterinary microbiology* 1994; 40(1-2): 23–39.



- USDA. United States Department of Agriculture/Animal and Plant Health Inspection Service/Veterinary Services -Assessment of pathways for the introduction and spread of *Mycobacterium bovis* in the United States 2009 2011.
- van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Molecular pathology* 1998; 51(4): 209–214.
- van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, Nagelkerke NJ, van Soolingen D. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *Journal of clinical microbiology* 2002; 40(12): 4628–4639.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology* 1993; 31(2): 406–409.
- van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases* 2012; 18(4): 653–655.
- van Ingen J, Zwaan Rd, Dekhuijzen R, Boeree M, van Soolingen D. Region of Difference 1 in Nontuberculous *Mycobacterium* Species Adds a Phylogenetic and Taxonomical Character. *Journal of Bacteriology* 2009; 191(18): 5865–5867.
- van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000; 7(2): 155–160.
- van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of internal medicine* 2001; 249(1): 1–26.
- van Soolingen D, Haas PE de, Haagsma J, Eger T, Hermans PW, Ritacco V, Alito A, van Embden JD. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 1994; 32(10): 2425–2433.

- van Soolingen D, Haas PE de, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 1993; 31(8): 1987–1995.
- Venkatesan BM, Dorvel B, Yemenicioglu S, Watkins N, Petrov I, Bashir R. Highly Sensitive, Mechanically Stable Nanopore Sensors for DNA Analysis. *Adv. Mater.* 2009; 21(27): 2771–2776.
- Vergne I, Chua J, Lee H-H, Lucas M, Belisle J, Deretic V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(11): 4033–4038.
- Vergne I, Fratti RA, Hill PJ, Chua J, Belisle J, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Molecular biology of the cell* 2004; 15(2): 751–760.
- Veyrier F, Pletzer D, Turenne C, Behr MA. Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evolutionary Biology* 2009; 9: 196.
- Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-Specific Gamma Interferon Production with Pathology in Cattle following *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination against Experimental Bovine Tuberculosis. *Infection and Immunity*. 2002; 70(6): 3026–3032.
- Vordermeier HM, Whelan A, COCKLE PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8(3): 571–578.
- Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson C, Bacher G, Pieters J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science (New York, N.Y.)* 2004; 304(5678): 1800–1804.

- Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *The Lancet. Infectious diseases* 2013a; 13(2): 137–146.
- Walker TM, Monk P, Smith EG, Peto TEA. Contact investigations for outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis*: advances through whole genome sequencing. *Clinical microbiology and infection the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2013 b; 19(9): 796–802.
- Walter MC, Zwirgmaier K, Vette P, Holowachuk SA, Stoecker K, Genzel GH, Antwerpen MH. MinION as part of a biomedical rapidly deployable laboratory. *Journal of Biotechnology* 2016.
- Wang L, Luhm R, Lei M. SNP and mutation analysis. *Advances in experimental medicine and biology* 2007; 593: 105–116.
- Wang L, Slayden RA, Barry CE, Liu J. Cell Wall Structure of a Mutant of *Mycobacterium smegmatis* Defective in the Biosynthesis of Mycolic Acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(10): 7224–7229.
- Waters WR, Nonnecke BJ, Olsen SC, Palmer MV. Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon-gamma responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Veterinary microbiology* 2007; 119(2-4): 277–282.
- Waters WR, Palmer MV, Buddle BM, Vordermeier HM. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 2012; 30(16): 2611–2622.
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic acids research* 2010; 38(Web Server issue): W326-31.
- Westermann J, Pabst R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *The Clinical investigator* 1992; 70(7): 539–544.
- Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNair J, Hewinson GR, Vordermeier MH. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *Journal of clinical microbiology* 2010; 48(9): 3176–3181.

- Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Journal of veterinary diagnostic investigation official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 1996; 8(3): 351–354.
- WHO. Weekly epidemiological record -Safety of BCG vaccine in HIV-infected children 2007.
- WHO. Tuberculosis and HIV: Tuberculosis - Global Tuberculosis Report 2016. [http://www.who.int/tb/publications/factsheet\\_global.pdf](http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf).
- Williams KJ, Ling CL, Jenkins C, Gillespie SH, McHugh TD. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. Journal of Medical Microbiology 2007; 56(5): 598–602.
- Wilson GJ, Carter SP, Delahay RJ. Advances and prospects for management of TB transmission between badgers and cattle. Veterinary microbiology 2011; 151(1-2): 43–50.
- Witney AA, Cosgrove CA, Arnold A, Hinds J, Stoker NG, Butcher PD. Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. BMC medicine 2016; 14: 46.
- Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clinical microbiology and infection the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2008; 14(10): 908–934.
- Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland) 2001; 81(1-2): 147–155.
- Wu CW, Schmoller SK, Bannantine JP, Eckstein TM, Inamine JM, Livesey M, Albrecht R, Talaat AM. A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Microbial pathogenesis 2009; 46(4): 222–230.
- Xia E, Teo Y-Y, Ong RT-H. SpoTyping: Fast and accurate in silico *Mycobacterium* spoligotyping from sequence reads. Genome Medicine 2016; 8(1): 1.

- Zaczek A, Brzostek A, Kuron A, Wojtasik A, Sajduda A, Dziadek J. Development of a new ligation-mediated PCR method for the differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains. The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 2014; 18(3): 302–309.
- Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbes and infection 2003; 5(2): 159–167.
- Zanella G, Durand B, Hars J, Moutou F, Garin-Bastuji B, Duvauchelle A, Ferme M, Karoui C, Boschirolu ML. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. Journal of wildlife diseases 2008; 44(1): 99–108.
- Zarden CFO, Marassi CD, Figueiredo EEES, Lilenbaum W. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. The Veterinary record 2013; 172(5): 130.
- Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, Shi W, Zhang L, Wang H, Wang S, Zhao G, Zhang Y. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Ra versus H37Rv. PLOS ONE 2008; 3(6): e2375.
- Zumárraga MJ, Martin C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F, Ramos MC, Cataldi A, van Soolingen D, Romano MI. Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South America. Journal of Clinical Microbiology 1999; 37(2): 296–303.

## VIII ANHANG TABELLEN UND ABBILDUNGEN

### ANHANG TABELLEN

**Tabelle A 1: PCR-Ergebnisse der RD4-Subtypisierung von drei *M.-caprae*-Isolaten aus Patienten anhand des in der Publikation veröffentlichten Multiplex-RD4-PCR-Ansatzes**

RD4-Subtyp	Isolat ID	Jahr	RD4 internal left part	RD4 internal central part	RD4 38-kb deletion flanking	RD4 5-kb deletion flanking
Allgäu	14-0040819-001-01	2014	+	+	-	-
Allgäu	14-0040820-001-01	2014	+	+	-	-
Allgäu	14-0127901-001-01	2014	+	+	-	-

ANHANG ABBILDUNGEN

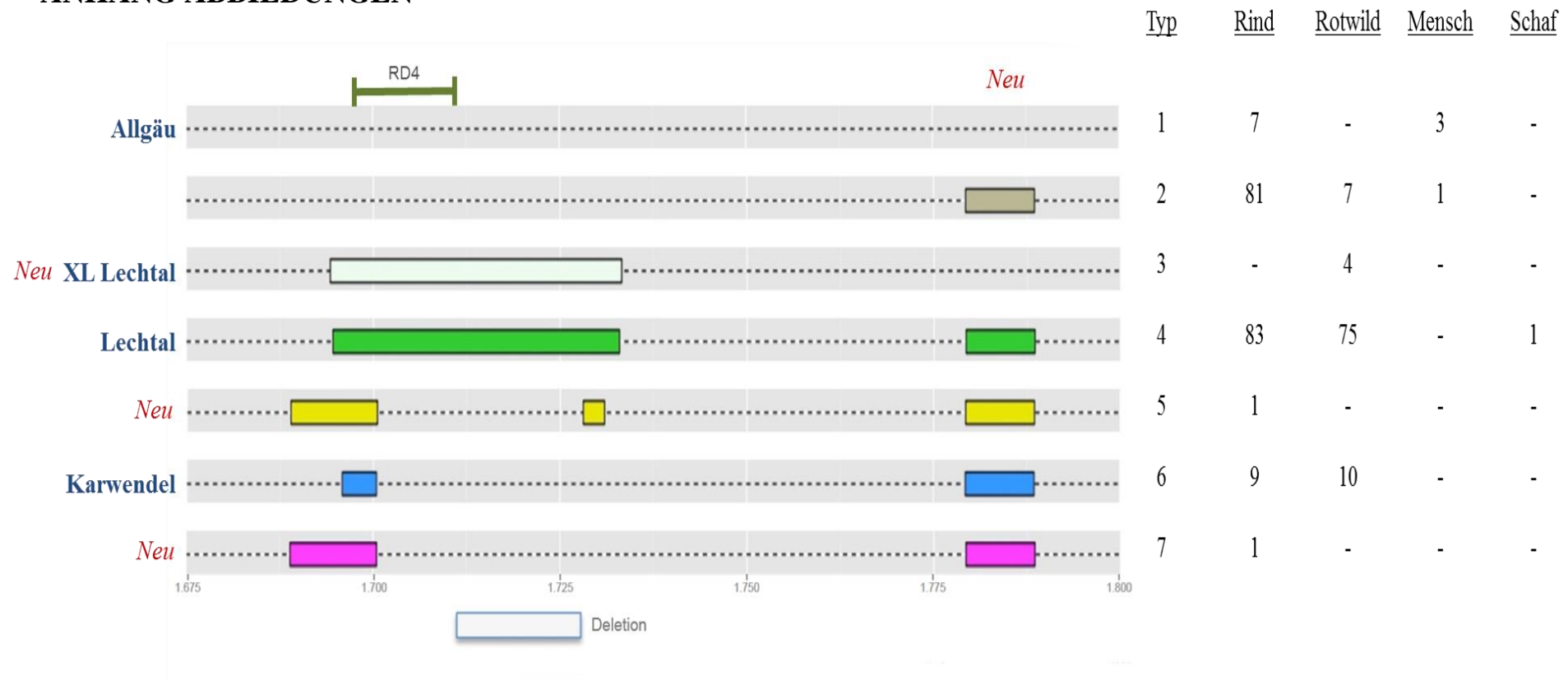
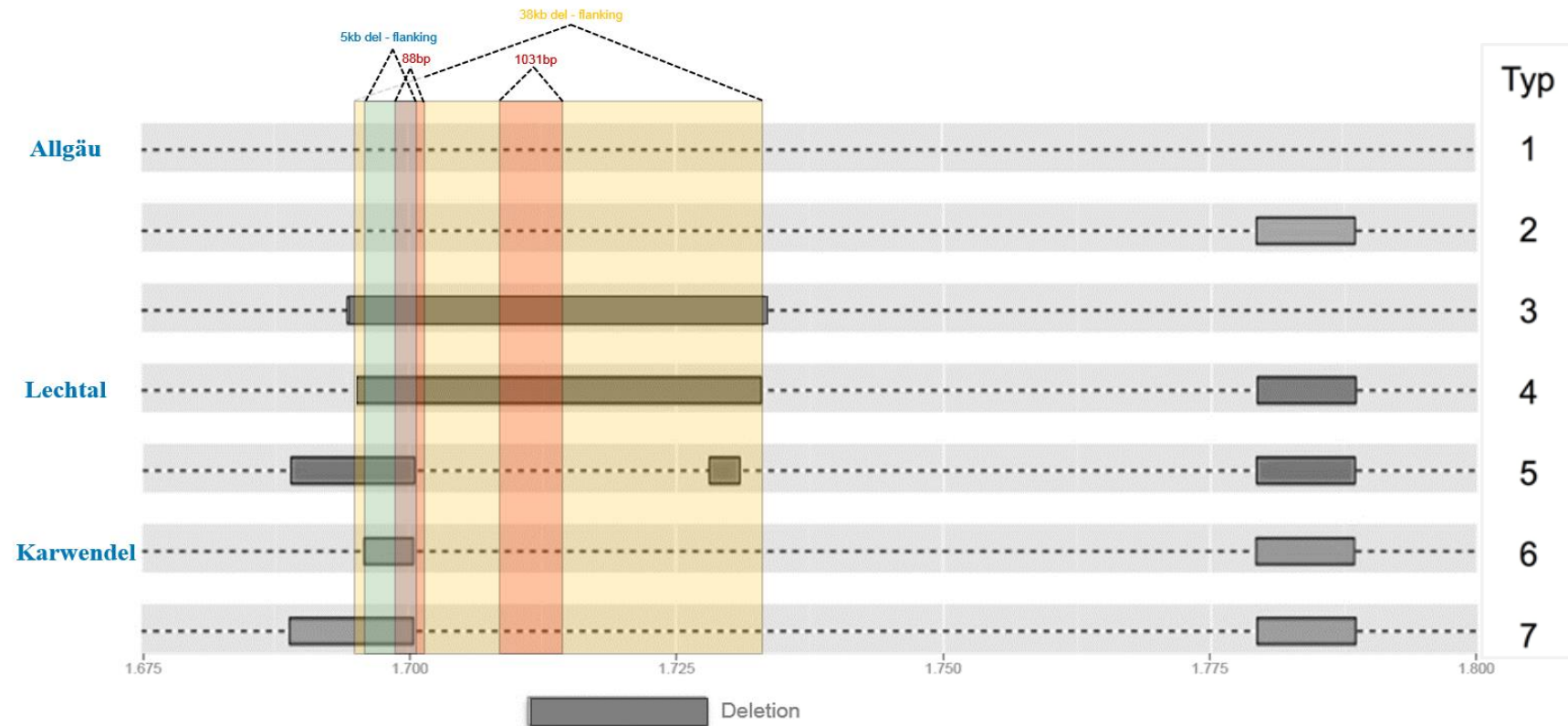


Abbildung A 1: Deletionen in der RD4-Region und RD4-nahen-Regionen, sowie die Häufigkeit des Vorkommens bei *Mycobacterium-caprae*-Isolaten aus den Wirtstieren. Ein Genomsequenzabgleich zwischen dem *M.-caprae*-Referenzgenom und dem der 246 Isolate bestimmte, welcher Teil der RD4-Region vorhanden oder deletiert ist. Der Aufbau der RD4-Region identifizierte insgesamt sieben verschiedene RD4-Typen, die schematisch dargestellt sind. Die rechteckigen Bereiche zeigen eine Deletion im Genom an. Die sequenzierten Genome wurden diesen Typen zugeordnet und die Häufigkeit des Vorkommens jedes Typs in der Wirtspezies ist rechts angegeben





**Abbildung A 2:** Darstellung der Genomsequenz von *Mycobacterium caprae* im Bereich der RD4-Region. Abgebildet sind die gemappten MiSeq-Sequenz-Daten der Isolate 09/RW044 (Allgäu-Subtyp), 10/RW079 (Karwendel-Subtyp), 11/D102 (Lechtal-Subtyp) und 13-0108370-001-01 (Neuer XL Lechtal) auf das Referenzgenom von *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank database, accession number CP003248) im IGV (Sequenz in 5' - 3' Richtung)



**Abbildung A 3: Mögliche Sequenz-Detektion, die der Multiplex-RD4-PCR-Ansatz bei den Typen 1 bis 7 erlaubt. Die rechteckigen Bereiche zeigen Deletionen im Genom von *M. caprae* an. Ein positives PCR Ergebnis wird bei Typ 1 (Allgäu-Subtyp), Typ 2, Typ 4 (Lechtal-Subtyp) und Typ 6 (Karwendel-Subtyp) erwartet, jedoch eine genaue Differenzierung zwischen Typ 1 (Allgäu-Subtyp) und Typ 2 kann anhand der RD4-Region mit dem in der Publikation etablierten Multiplex-RD4-PCR-Ansatz nicht erfolgen. Die jeweilig definierte Amplifikatgröße und Primersequenzen sind nach Domogalla et al. (DOMOGALLA et al., 2013) beschrieben. Ein negatives PCR-Ergebnis ist für Typ 3, Typ 5 und Typ 7 zu erwarten und eine Differenzierung dieser Typen ist nicht möglich**

## IX DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei all denen, die zur Erstellung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön richtet sich an Herrn Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner für die Bereitstellung dieses innovativen Dissertationsthemas, für seine umfangreiche und fachkundige Unterstützung und seine sehr gute Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Vielen Dank!

Ein spezieller Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger für die jederzeit gegenwärtige Betreuung, das Vertrauen und Engagement zur Erstellung dieser Arbeit.

Meinen Dank möchte ich auch aussprechen der gesamten Arbeitsgruppe LAFUGA von Herrn Dr. Helmut Blum am Genzentrum für die Kooperation, die enge Zusammenarbeit und den regen Erfahrungs- und Informationsaustausch, sowie die mir gegenüber stets zuvorkommende Freundlichkeit und Teamintegration. Besonders hervorzuheben ist hierbei Herr Dr. Stefan Krebs, der mich sowohl praktisch, als auch fachlich immer unterstützte, viele Fragen beantwortete und bei Problemlösungen immer zur Stelle war. Auch möchte ich mich bei Ashok Varadharajan bedanken, der viele Lösungsvorschläge in die Tat umsetzte und mich technisch unterstützte.

Generell möchte ich mich bei allen Autoren der beiden Publikationen für die freundliche Unterstützung und zuverlässige Kooperation bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Anna Lena Rettinger für die gute Zusammenarbeit und ihr Engagement bedanken.

Ein Dankeschön auch an Frau Susanne Gellert und Frau Heike Lang für viele hilfreiche Anregungen und die uneingeschränkte Unterstützung im Labor, speziell Susi, die mir in jeder erdenklichen Situation ein offenes Ohr schenkte und mir mit aufmunternden Worten oftmals zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. Schirin Semmelmann und Mark Kriegbaum bedanken, auf deren Hilfe ich immer zählen konnte und auch für einen Scherz und Spaß im Labor stets zu haben waren. Mein Dank gilt außerdem Frau Shari Fell für die tolle Zeit und die gegenseitige Unterstützung während der gesamten Doktoratszeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, Brigitte Bröckl und Dr. Gerhard Bröckl, die mir in meinem Leben so viel ermöglicht haben, mir immer Rückhalt gaben und mir jederzeit helfend zur Seite stehen, und ebenso an meine Schwester Cornelia, die mich stets tatkräftig unterstützt hat. Danke, dass wir vier immer zueinander halten!!

Einen herzlichen Dank auch an meinen Freund Quirin, der mir in dieser, nicht immer leichten Zeit, mit viel Geduld, Ruhe und Liebe beigestanden ist.

Last but not least ein großes Dankeschön an all meine Freunde und Co-Doktoranden für die lustigen Ablenkungen und die schöne Zeit, an die ich mich sehr gerne zurückerinnere.